UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DES SCIENCES

Le dosage des protéines totales et du lactose du lait : revue des méthodes actuelles et contribution à l'étude et au développement de nouvelles méthodes d'analyse automatique

PARTIE DE LA THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

JACQUES-OLIVIER BOSSET
Ingénieur-chimiste

1975

Imprimerie A. Charlet-Roy, Lausanne
1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0017

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DES SCIENCES

Le dosage des protéines totales et du lactose du lait : revue des méthodes actuelles et contribution à l'étude et au développement de nouvelles méthodes d'analyse automatique

PARTIE DE LA THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

JACQUES-OLIVIER BOSSET

Ingénieur-chimiste

Imprimerie A. Charlet-Roy, Lausanne
1976

En accord avec la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, ce travail a été mené à temps partiel de janvier 1971 à décembre 1975 dans les laboratoires de la Station fédérale de recherches laitières de Liebefeld - Berne. La direction en a été assurée par

Monsieur le Docteur BERNARD BLANC

Professeur associé et directeur de ladite Station

et conjointement par

Monsieur le Docteur ERIC PLATTNER

Professeur à l'Institut de génie chimique de l'EPFL

Je tiens à exprimer à mes deux directeurs de thèse, Messieurs les Professeurs BERNARD BLANC et ERIC PLATTNER, ma vive reconnaissance pour les conseils précieux dont ils m'ont fait bénéficier, pour toutes les facilités qu'ils m'ont accordées, ainsi que pour les moyens qu'ils ont mis à ma disposition pour la réalisatiion de ce travail.

Analytica Chimica Acta, 67 (1973) 403–413

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

NOUVELLE MÉTHODE DE DOSAGE AUTOMATIQUE DE SUBSTANCES OXYDANTES OU RÉDUCTRICES PAR POTENTIOMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE

PARTIE I. ÉTUDE THÉORIQUE[†]

J. O. BOSSET et B. BLANC

Station Fédérale de Recherches Laitières. CH-3097 Liebefeld-Berne (Suisse)

E. PLATTNER

Institut de Génie Chimique, Ecole Polytechnique Fédérale, CH-1025 Lausanne (Suisse)

(Reçu le 28 février 1973)

INTRODUCTION ET DÉVELOPPEMENT THÉORIQUE DE LA MÉTHODE DE SCHIERJOTT

Dans sa publication sur la détermination de systèmes rédox en flux continu, Schierjott[1] propose une méthode qui consiste à mesurer la différence des potentiels $E_{\text{rédox } i} - E_{\text{rédox } j} = \Delta E_{\text{rédox } j}^{\ i}$ que montre une solution titrante à deux instants consécutifs donnés i et j d'une même réaction d'oxydo–réduction. L'auteur propose pour un "Auto-Analyzer" de Technicon un "flow diagram" dans lequel i est le début de la réaction et j la fin de la réaction. La seconde condition est implicite mais non impérative. La solution titrante est composée d'un oxydant (respectivement d'un réducteur) réversible, dont le couple (forme oxydée/forme réduite) suit la loi de Nernst:

$$E_{\text{rédox}} = E^0_{\text{rédox}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{o}{r} \tag{1}$$

où o = activité* de la forme oxydée et r = activité de la forme réduite de la solution "titrante". On désignera par o^* et r^* les activités correspondantes de la solution "titrée".

L'auteur considère le cas de solutions suffisamment diluées pour que les coefficients d'activité deviennent unitaires (activités = concentrations) et celui de $n = 1$. Il est alors possible de formuler la base théorique de sa méthode de la manière suivante:

$$\Delta E_{\text{rédox}\ j}^{\ i} = \frac{RT}{F} \left[\ln \frac{o_i}{r_i} - \ln \frac{o_j}{r_j} \right] \tag{2}$$

Vu que Schierjott choisit, aussi bien pour i que pour j, des conditions de

[†] Extrait d'une thèse de doctorat publiée prochainement.

* L'invariabilité de tous les volumes permet de substituer systématiquement la dimension "activité" ou "concentration" à celle de "quantité".

travail proches de $E^0_{\text{rédox}}$, à savoir:

$$\frac{o_i}{r_i} \cong \frac{o_j}{r_j} \cong 1 \tag{3}$$

il est possible pour i comme pour j de procéder au développement en série suivant:

$$\ln \frac{o}{r} = \ln u = \sum_{n=1}^{n=\infty} (-1)^{n+1} \cdot n^{-1} \cdot (u-1)^n \tag{4}$$

à condition que $0 < u < 2$, condition vérifiée puisque:

$$u_i \cong u_j \cong 1 \tag{3a}$$

En ne gardant que le terme du développement correspondant à $n=1$, on obtient après substitution pour i et pour j la nouvelle expression:

$$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} = \frac{RT}{F} (\ln u_i - \ln u_j) \cong \frac{RT}{F} (u_i - u_j) \tag{5}$$

La nouvelle expression ne comporte plus de logarithme. Elle est donc partiellement linéarisée.

Dans le cas du dosage d'un réducteur de concentration r^* par un oxydant de concentration o, on peut écrire stoechiométriquement que:

$$o_i - o_j = +\Delta o^i_j = -(r_i - r_j) = -\Delta r^i_j = +\Delta r^{*\,i}_{\ j} \tag{6}$$

où Δr^{*i}_j est la variation de la concentration de la forme réduite du réducteur entre i et j (par analogie, Δo^{*i}_j serait celle de la forme oxydée de ce dernier). Si la réaction est complète, on a alors:

$$\Delta r^{*\,i}_{\ j} = r^* \tag{7}$$

Après introduction des égalités (4) et (6) dans l'expression (5), on peut récrire cette dernière sous la forme:

$$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} = \frac{RT}{F}\left[\frac{o_i}{r_i} - \frac{o_i - \Delta o^i_j}{r_i - \Delta r^i_j}\right] = \frac{RT}{F}\left[\frac{o_i}{r_i} - \frac{o_i - \Delta r^{*\,i}_{\ j}}{r_i + \Delta r^{*\,i}_{\ j}}\right] =$$

$$= \frac{RT}{F}\left[\frac{o_i + r_i}{r_i (r_i + \Delta r^{*\,i}_{\ j})}\right] \Delta r^{*\,i}_{\ j} \tag{8}$$

L'hypothèse de travail définie sous (3) permet de tirer l'inégalité:

$$\Delta r^{*\,i}_{\ j} \ll r_i \tag{9}$$

Cette dernière inégalité permet de simplifier une seconde fois par approximation l'expression de la différence de potentiel rédox qui devient:

$$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} \cong \frac{RT}{F} \cdot \frac{o_i + r_i}{r_i^2} \cdot \Delta r^{*\,i}_{\ j} \tag{10}$$

En définitive, la relation (10) indique que la différence de potentiel d'oxydo-réduction du couple réversible o/r entre les instants i et j de la même réaction est directement proportionnelle à la concentration du réducteur consommé pendant

ce laps de temps, à condition de travailler dans le voisinage de $E^0_{\text{rédox}}$ (concentration égale des formes oxydée et réduite). Cette relation peut donc être condensée sous la forme:

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} \cong K^1 \cdot \Delta r^{*\,i}_{\,j} \tag{10a}$$

où $\Delta E_{\text{rédox}} = K^1 \cdot r^*$ (réaction complète).

CRITIQUE DE LA MÉTHODE ET PROPOSITION D'UNE VARIANTE

Si la méthode de Schierjott est intéressante pour les réactions d'oxydo–réduction rapides et réversibles, elle n'est pas idéale pour les réactions lentes, comme par exemple l'oxydation de certaines substances organiques. Dans de tels cas, il faut non seulement opérer à haute température pour augmenter la vitesse de la réaction, mais encore engager un excès suffisant de réactif pour influencer la cinétique rédox. Il en résulte que l'hypothèse définie sous (3) ($\Delta r^{*\,i}_{\,j} \ll o_i \cong r_i$) est peu favorable à cet égard puisqu'elle oblige à travailler dans le domaine où la solution "titrante" offre sont pouvoir tampon maximum, donc une assez faible sensibilité analytique. D'autre part, la présence dans le réactif d'une concentration r_i, respectivement r_j (forme inactive pour l'oxydation) pratiquement aussi élevée que o_i, respectivement o_j, peut même nuire dans certains cas à la solubilité de la forme active (particulièrement pour le $Ce(SO_4)_2$). Sur le plan économique finalement, le coût du réactif pour une analyse donnée est le double de celui calculé pour o_i seul.

Tenant compte des remarques précédentes, la variante proposée dans ce travail est basée sur des conditions expérimentales très différentes ($\Delta r^{*\,i}_{\,j} \ll o_i \neq r_i$). Elle peut être formulée de la manière suivante, à partir de la relation différentielle (2):

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{o_i \cdot r_j}{r_i \cdot o_j} = \frac{RT}{F} \ln \frac{o_i(r_i - \Delta r_j^i)}{r_i(o_i - \Delta o_j^i)} \tag{11}$$

En substituant les égalités de (6) dans la relation (11), on obtient:

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{o_i(r_i + \Delta r^{*\,i}_{\,j})}{r_i(o_i - \Delta r^{*\,i}_{\,j})} \tag{12}$$

puis après simplification:

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{(\Delta r^{*\,i}_{\,j})^{-1} + (r_i)^{-1}}{(\Delta r^{*\,i}_{\,j})^{-1} - (o_i)^{-1}} \tag{13}$$

Comme $\Delta r^{*\,i}_{\,j}$ est une fraction de r^* (total), $\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i}$—à T, o_i, r_i et j donnés—est une nouvelle fonction bijective de la concentration initiale en réducteur. Réciproquement, il est possible de déterminer la teneur en réducteur d'une solution inconnue en mesurant le $\Delta E_{\text{rédox}}$ qui lui est associé.

Néanmoins, sous sa forme générale, la relation (13) ne se prête guère, vu sa complexité, à une application à des analyses de routine. En effet, l'exponentielle $[F \cdot (RT)^{-1} \cdot \Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i}]$ varie hyperboliquement avec la consommation du réducteur.

En choisissant les conditions expérimentales initiales telles que:

$$r_i \ll \Delta r^{*\,i}_{\,j} \ll o_i \tag{14}$$

il devient possible de simplifier par approximation la relation (13):

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} \cong \frac{RT}{F} \ln \frac{\Delta r^{*\,i}_{\,j}}{r_i} = \frac{RT}{F} \ln \Delta r^{*\,i}_{\,j} - \frac{RT}{F} \ln r_i \qquad (15)$$

Pour une température maintenue constante au cours de la réaction, il est possible de regrouper toutes les constantes dans la nouvelle expression:

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} \cong K^{\text{II}} \ln \Delta r^{*\,i}_{\,j} + K^{\text{III}} \qquad (15a)$$

c'est à dire:

$$\Delta r^{*\,i}_{\,j} \cong \exp \frac{\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} - K^{\text{III}}}{K^{\text{II}}} \qquad (15b)$$

Lorsque les hypothèses de travail définies par la relation (14) sont respectées, l'argument de la fonction logarithmique devient linéaire. La différence des potentiels rédox du couple réversible o/r à deux instants donnés i et j est proportionnelle* au logarithme de la concentration du réducteur consommé entre ces mêmes instants. Les relations (15a) et (15b) sont à la base de la variante proposée.

Si de surcroît la teneur en réducteur (respectivement en oxydant) à doser ne varie que faiblement d'un échantillon à l'autre, on peut assimiler le segment de la courbe logarithmique considéré (*cf.* relation 15) à un segment de droite. Cette seconde simplification par approximation se justifie à nouveau par un développement en série. Dans ce cas, on retrouve une relation de simple proportionnalité entre la teneur en réducteur et la différence de potentiel rédox mesurée (*cf.* relation 10a) à une constante additive près, du type:

$$\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} \cong K^{\text{IV}} \cdot \Delta r^{*\,i}_{\,j} + K^{\text{V}} \qquad (16)$$

Si la précision demandée ne permet cette dernière approximation en raison de l'écart existant entre le logarithme et son développement en série, l'exploitation des données analytiques peut se faire par l'emploi d'une petite calculatrice, d'un papier semi-logarithmique ou d'une table de conversion.

COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES

Les deux méthodes décrites se distinguent essentiellement par leurs conditions expérimentales. S'il faut dans les deux cas engager un excès d'oxydant par rapport au réducteur ($\Delta r^{*\,i}_{\,j} \ll o_i$), Schierjott indique $\Delta r^{*\,i}_{\,j} \ll r_i$, alors que la variante proposée préconise $\Delta r^{*i}_{j} \gg r_i$. Cette dernière solution est plus adéquate que la précédente lorsque la réaction rédox est lente même avec un oxydant (respectivement un réducteur) puissant, puisqu'elle offre—au dessus d'un certain seuil—une meilleure sensibilité pour un même excès:

$$Q = o_i / \Delta r^{*\,i}_{\,j} \qquad (17)$$

A titre d'exemple, il est possible de calculer les $\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i}$ obtenus par l'une et l'autre méthode pour une concentration égale en oxydant ($o_i = 1$) et une même température T.

---

* A une constante additive près (fonction affine).

Calcul de $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ *selon Schierjott*

$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ dépend évidemment du domaine de travail considéré. Plus on le choisit grand, c'est à dire plus on s'écarte des conditions définies sous chiffre (3a) ($u_i \cong 1$), moins bonne est l'approximation supposée par la relation (10a), comme le montre le Tableau I.

TABLEAU I

ESTIMATION DE L'ERREUR COMMISE SUR $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ DUE AU DÉVELOPPEMENT EN SÉRIE DÉFINI SOUS CHIFFRE (4)

$u_i = o_i/r_i$ *(fraction ordinaire)*	$u_i - 1$ *(approximation)*	$\ln u_i$ *(Nernst)*	$(u_i - 1) - (\ln u_i)$ *(erreur absolue)*	$\{[(u_i - 1) - (\ln u_i)]/\ln u_i\}100$ *{erreur relative (%)}*
50/50	0.0000	0.0000	0.0000	0.00
55/45	0.2222	0.2007	0.0215	+10.71
60/40	0.5000	0.4055	0.0945	+23.30
65/35	0.8571	0.6190	0.2381	+38.47
70/30	1.3333	0.8473	0.4860	+57.36

L'auteur indique qu'il est possible de choisir le rapport initial $u_i = o_i/r_i = r_i^{-1}$ entre 2.3 et 1.0 approximativement, le rapport final $u_j = o_j/r_j$ étant choisi aussi voisin que possible de 1. Pour les conditions extrêmes de validité de l'approximation, à savoir $u_i = 2.33$ (70% de forme oxydée/30% de forme réduite), on peut écrire en fonction de Q:

$$\Delta E_{\text{A}} \cong \Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} \frac{F}{RT} = \frac{o_i + r_i}{r_i^2} \Delta r^{*}{}^{i}_{j} = \frac{1 + u_i^{-1}}{u_i^{-2}} Q^{-1} = \frac{u_i + u_i^2}{Q} = \frac{7.77}{Q} \qquad (18)$$

Calcul de $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ *selon la variante proposée*

L'hypothèse de travail définie sous chiffre (14) indique que $r_i << o_i$, ce qui revient à considérer r_i comme une "impureté" (forme réduite de l'oxydant) dans le réactif (forme oxydée de ce dernier). Si l'on définit par K la teneur du réactif en cette impureté, c'est à dire:

$$K = r_i/o_i = u_i^{-1} \qquad (19)$$

il devient possible de calculer le $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ obtenu en fonction de K (paramètre) et de Q (variable):

$$\Delta E_{\text{B}} \cong \Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} \frac{F}{RT} = \ln \frac{\Delta r^{*}{}^{i}_{j}}{r_i} = \ln (Q^{-1} K^{-1}) = -\ln KQ = \ln u_i/Q \qquad (20)$$

On déduit de la relation (20) que la sensibilité de la méthode proposée dépend de la pureté du réactif utilisé. A $Q > 0$, elle décroît lorsque K croît. Pour $K = 7 \cdot 10^{-3}$★, le calcul donne:

$$\Delta E_{\text{B}} \cong -\ln(0.007\ Q) \qquad (20a)$$

★ *Cf.* les résultats expérimentaux (Partie II) (ref. 2).

Calcul du seuil d'"équisensibilité" des méthodes

Comparer la sensibilité des deux méthodes revient à comparer leur $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$. En résolvant l'équation:

$$\Delta E_A = \Delta E_B \tag{21}$$

on détermine la valeur de Q, désignée par Q_s, pour laquelle les deux méthodes sont équivalentes.

Dans le cas particulier envisagé où $K = 7 \cdot 10^{-3}$ et $u_i = 2.33$, la résolution graphique de cette équation conduit à la valeur $Q_s = 1.77$. Pour tout excès de réactif Q supérieur à l'excès équivalent Q_s défini précédemment, ce qui est généralement le cas en pratique, la méthode proposée est nettement plus sensible que celle de Schierjott (*cf.* Tableau II).

TABLEAU II

COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DES DEUX MÉTHODES POUR QUELQUES VALEURS DE Q

$Q = o_i/\Delta r^{*i}_j$	$\Delta E_A \cdot (RT/F) = RT\ 7.77/(F \cdot Q)$ [a]	$\Delta E_B \cdot (RT/F) = (-RT/F) \cdot \ln(0.007\ Q)$ [b]
1.00	200.0 mV	127.6 mV
1.77 [c]	112.9 mV	112.9 mV
2.00	100.0 mV	109.8 mV
5.00	40.0 mV	86.2 mV
10.00	20.0 mV	68.4 mV

[a] Méthode de Schierjott, pour $u_i = 2.77$ (à 25°) (*cf.* éqn. 18).
[b] Variante proposée, pour $K = 7 \cdot 10^{-3}$ (à 25°) (*cf.* éqn. 20a).
[c] $Q = Q_s$ (équisensibilité).

Jusqu'ici tous les calculs ont été effectués sur la base de $K = 7 \cdot 10^{-3}$. Si l'on parvient à abaisser le taux d'impureté par exemple jusqu'à $K = 1 \cdot 10^{-3}$ (purification, choix d'un produit plus pur, etc.), on abaisse encore la valeur de Q_s à 1.15, même pour les conditions de validité extrêmes envisagées, à savoir $u_i = 2.33$ (70%/30%).

OPTIMISATION DES DIVERS PARAMÈTRES

Une analyse de la relation fondamentale (13) permet de caractériser le rôle des principaux paramètres qui y interviennent, à savoir la concentration du réactif, la température et le temps de réaction.

Influence de la concentration du réactif: étude de $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ en fonction de Q ($o_i = 1$)

L'étude de la concentration du réactif revient à optimiser le rapport $Q = o_i/\Delta r^{*i}_j$. Après substitution de r_i par $K \cdot o_i$ (*cf.* éqn. 19) et amplification de la fraction par Δr^{*i}_j, l'argument du logarithme de l'éqn. (13) devient, pour $Q \neq 0$:

$$\exp\left[\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} \cdot F/RT\right] = \frac{1 + (KQ)^{-1}}{1 - Q^{-1}} = \frac{KQ + 1}{K(Q - 1)} \tag{22}$$

De cette dernière expression, on peut tirer quelques informations importantes concernant le comportement du logarithme pour certaines valeurs de Q:

pour $Q \gtrless 1$ (stoechiométrie oxydant/réducteur), $\Delta E_{\text{rédox}} \to \infty$: la fonction croît indéfiniment. La valeur $Q=1$ est un pôle de la fonction.

pour $Q \to \infty$ ("très grand"), $\Delta E_{\text{rédox}} \to 0$: on perd toute sensibilité.

pour $Q<1$, $\Delta E_{\text{rédox}}$ n'est plus défini (réaction incomplète par manque de réactif): logarithme d'une valeur négative.

D'autre part, on remarque que, pour avoir en début de réaction un $E_{\text{rédox}\,i}$ défini, il est nécessaire de disposer d'un $r_i \neq 0$, si minime soit-il, c'est à dire un $K \neq 0$.

L'inégalité (14) renseigne de manière plus précise sur le choix de Q, puisqu'elle lui impose une borne supérieure et une borne inférieure:

$$r_i = K o_i \ll \Delta r^{*\,i}_j \ll o_i \Rightarrow K \ll \frac{\Delta r^{*\,i}_j}{o_i} \ll 1 \Rightarrow 1 \ll Q \ll K^{-1} \tag{23}$$

$$\text{Pour } K = 7 \cdot 10^{-3}, \text{ cela implique: } 1 \ll Q \ll 140 \tag{24}$$

Dans le domaine d'existence de Q défini par la double inégalité (23), on peut chercher la valeur de Q (optimisation) qui rende minimale la différence absolue D existant entre les formes exacte (*cf.* relations 13 et 22) et approchée de la fonction $\Delta E_{\text{rédox}\,j}^{\,i} = f(Q)$ (*cf.* relations 15 et 20), pour $K \neq 0$:

$$D = \frac{RT}{F} \cdot \left[\ln \frac{KQ+1}{K(Q-1)} - \ln \frac{1}{KQ} \right] = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{(KQ+1)Q}{Q-1} \tag{25}$$

Les valeurs pour lesquelles la dérivée première par rapport à Q de cette nouvelle fonction de Q s'annule, donnent les extrema de cette dernière:

$$\frac{dD}{dQ} = \frac{KQ^2 - 2KQ - 1}{(KQ+1)Q(Q-1)} = 0 \tag{26}$$

à savoir:

$$Q_1 = \frac{K + (K^2+K)^{\frac{1}{2}}}{K} = 1 + \frac{(K^2+K)^{\frac{1}{2}}}{K} \tag{27}$$

$$Q_2 = \frac{K - (K^2+K)^{\frac{1}{2}}}{K}$$

Seule la solution Q_1 est admissible. La seconde, négative, n'a pas de signification physique, puisque pour $K>0$, $\Rightarrow K^2 < K^2 + K$.

$$\text{Si } K \ll 1 \Rightarrow K^2 \ll K \Rightarrow Q_1 \cong 1 + K^{-\frac{1}{2}} \text{ (première approximation)} \tag{27a}$$

$$\text{Si } K <<< 1 \Rightarrow Q_1 \cong K^{-\frac{1}{2}} \text{ (seconde approximation)} \tag{27b}$$

Pour $K = 7 \cdot 10^{-3}$, le calcul exact donne 13.0. Pour les valeurs de K égales à $1 \cdot 10^{-2}$ et $1 \cdot 10^{-3}$, on trouve pour Q_1 respectivement 10.0 et 30.0.

Le signe du coefficient du terme dominant étant positif, l'extremum obtenu est bien le minimum recherché, le dénominateur étant toujours positif si $Q>1$.

Le Tableau III donne en fonction de Q les différences absolues $D \cdot F/RT$, définies par la relation (25), et relatives $[D \cdot F/RT] \cdot \{\ln[(KQ+1)(KQ-K)^{-1}]\}^{-1}$

TABLEAU III

COMPARAISON DES FORMES EXACTE ET APPROCHÉE (VARIANTE PROPOSÉE) DE LA FONC
$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}{}_{j} \cdot (F/RT) = f(Q)$

Q	$(KQ+1)/(KQ-1)$	$(KQ)^{-1}$	$\ln[(KQ+1)/(KQ-K)]$	$\ln(KQ)^{-1}$	$D(F/RT)$	$[D(F/RT)\cdot 100]/\{\ln[(KQ+1)/(KQ-$
1.00	∞	142.857	∞	2.155	∞	—
1.77	187.827	80.710	5.236	4.391	0.845	16.14%
2.00	144.857	71.429	4.976	4.269	0.707	14.21%
3.00	72.929	47.619	4.290	3.864	0.426	9.33%
4.00	48.952	35.714	3.891	3.576	0.315	8.10%
5.00	36.964	28.571	3.610	3.353	0.257	7.12%
10.00	16.984	14.286	2.832	2.059	0.173	6.11%
13.00	12.988	10.989	2.565	2.397	0.168	6.55%
15.00	11.276	9.524	2.422	2.254	0.168	6.94%
20.00	8.571	7.143	2.148	1.966	0.182	8.47%

calculées pour $K = 7 \cdot 10^{-3}$. Il confirme l'existence d'une différence absolue minimale pour $Q \cong 13.0$ et relative pour $Q = 10$. Il montre encore que les valeurs de la fonction exacte $\ln[(KQ+1)(KQ-K)^{-1}]$ sont toujours plus élevées que celles de la fonction approchée $\ln(1/QK)$. Cette constatation permet de diminuer encore l'écart existant entre ces deux fonctions puisqu'il est possible d'ajouter aux valeurs déduites de la fonction approchée une valeur constante (par exemple 0.168 ou 6.55% respectivement).

Par analogie, le Tableau IV donne l'écart $D' \cdot F/RT$, absolu et relatif, existant entre la fonction exacte $\ln[(KQ+1)(KQ-K)^{-1}]$ et l'approximation proposée par Schierjott $[(KQ+1)(KQ-K)^{-1}]-1$, pour la valeur extrême $K = u_i^{-1} = 1\,2.33 = 0.4286$.

La qualité de l'approximation de Schierjott décroit lorsque la sensibilité croît. L'optimisation de Q, qui rend minimale la différence D' existant entre les deux expressions considérées (*cf.* Tableau IV) conduit à $Q = \infty$, donc à une sensibilité nulle. D'autre part, on ne peut réduire la différence existant entre la fonction

TABLEAU IV

COMPARAISON DES FORMES EXACTE ET APPROCHÉE (SELON SCHIERJOTT) DE LA FONC
$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}{}_{j} \cdot (F/RT) = f(Q)$

Q	$(KQ+1)/(KQ-K)$	$\ln[(KQ+1)/(KQ-K)]$	$[(KQ+1)/(KQ-K)]-1$	$D'(F/RT)$	$[D'(F/RT)\cdot 100]/\{\ln[(KQ+1)/(KQ$
1.00	∞	∞	∞	—	—
2.00	4.333	1.467	3.333	−1.866	−127.20%
3.00	2.667	0.981	1.667	−0.686	− 69.93%
4.00	2.111	0.747	1.111	−0.364	− 48.73%
5.00	1.833	0.606	0.833	−0.227	− 37.46%
10.00	1.370	0.315	0.370	−0.055	− 17.46%
13.00	1.278	0.245	0.278	−0.033	− 13.47%
15.00	1.238	0.214	0.238	−0.024	− 11.21%
20.00	1.175	0.162	0.175	−0.013	− 8.02%
∞	1.000	0.000	0.000	−0.000	− 0.00%

approchée et la fonction exacte, puisque cette différence ne présente pas de composante constante.

Influence des températures de réaction et de mesure

La température intervient dans l'expression même du potentiel rédox (*cf.* formules 1, 2, 10 et 15) et dans la cinétique proprement dite de la réaction. Dans un cas comme dans l'autre, une augmentation de T est intéressante, puisqu'elle augmente d'une part le signal électrique $\Delta E_{\text{rédox}}$ et diminue de l'autre le temps de réaction. On recherchera donc la température la plus élevée et la plus constante possible.

Influence du temps de réaction

Théoriquement il faut choisir un temps j (pour effectuer la mesure) aussi proche que possible de la fin de la réaction, puisque le signal électrique obtenu croît au cours de la réaction. L'expérience montre que la vitesse de réaction est plus grande en début qu'en fin de réaction, l'équilibre étant atteint de façon asymptotique. Pourtant, si la réaction est très ou trop lente, il peut être néanmoins indiqué de choisir j avant la fin effective de la réaction, spécialement dans un analyseur automatique à flux continu, afin de garder pour la bobine de réaction des dimensions acceptables (perte de charge pour la pompe, dimension du bain marie, séparation des pics, etc.).

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que la variante proposée s'avère plus avantageuse que celle de Schierjott lorsqu'il est nécessaire de travailler avec un certain excès de réactif dans le but d'augmenter la cinétique. Cette variante permet encore d'utiliser le réactif de façon beaucoup plus rationnelle (coût, solubilité, préparation, etc.) puisque ce dernier n'est composé pratiquement que de sa forme active (forme oxydée pour un oxydant, forme réduite pour un réducteur).

A condition de doser un constituant dont la concentration ne varie que faiblement d'un échantillon à l'autre, ce qui est souvent le cas par exemple des produits biologiques dont la synthèse est contrôlée génétiquement, on peut encore considérer avec une bonne approximation que le signal $\Delta E_{\text{rédox}}{}_j^i$ obtenu sur l'enregistreur varie proportionnellement* avec la teneur en oxydant ou en réducteur à déterminer. Même dans le cas général, où cette condition quelque peu restrictive ne peut être observée, la méthode reste valable; le calcul est alors effectué en utilisant la relation (15b).

Finalement, la variante proposée présente encore un avantage: l'approximation proposée pour la fonction théorique exacte est meilleure que celle de Schierjott. Cette constatation doit être néanmoins assortie des quelques réserves suggérées par la remarque qui suit.

Remarque

L'analyse des valeurs obtenues lors du calcul des différences tant absolues que

*A une constante additive près.

relatives existant entre la fonction exacte et la fonction approchée (*cf.* Tableaux I et IV) suggère deux autres possibilités d'interprétation de la proportionnalité indiquée par Schierjott. En effet, si ces valeurs ne présentent aucune composante constante, elles sont néanmoins toutes munies du même signe algébrique et monotones croissantes avec u_i (respectivement décroissantes avec Q). Ce comportement des différences s'explique par le fait que le développement en série proposé sous chiffre (4) est effectué pour $u_i = 1$, c'est à dire à l'une des frontières du domaine de travail considéré. On peut donc en déduire les deux nouvelles méthodes d'approximation suivantes, valables aussi bien pour la méthode de Schierjott que celle proposée dans ce travail.

Considérer comme droite "de proportionnalité" la tangente à la courbe théorique en un point judicieusement choisi, situé à l'intérieur du domaine de travail. Les différences absolues et relatives seront toujours munies du même signe algébrique, mais plus faibles comparativement aux écarts précédents.

Considérer la droite de régression obtenue à partir d'un certain nombre de points de la courbe théorique (assimilée à une droite sur un certain segment) situés dans le domaine de travail considéré. Cette solution pratique est intéressante puisqu'elle donne par définition la fonction linéaire qui approche le mieux la fonction théorique. Cette opération permet de diminuer notablement la valeur absolue des écarts observés tant absolus que relatifs puisqu'elle les distribue bilatéralement de part et d'autre de la droite de proportionnalité sous forme de déviations positives et négatives. Les deux points d'intersection de cette droite avec la courbe théorique déterminent les deux valeurs pour lesquelles l'approximation est idéale (différences absolue et relative nulle).

RÉSUMÉ

Le travail a pour objet l'étude d'une nouvelle méthode destinée aux déterminations quantitatives de routine de substances oxydables ou réductibles. Après un développement mathématique et une critique de la méthode de Schierjott, les auteurs proposent une modification fondamentale des conditions expérimentales indiquées par Schierjott, afin d'accroître considérablement la sensibilité de la méthode. Cette amélioration se révèle particulièrement avantageuse lors du dosage de substances peu réactives, tels les glucides. Elle permet une diminution de la quantité, donc du prix du réactif utilisé par analyse et minimise le risque de précipitation de l'un des composés formés ou engagés. Le développement mathématique de cette variante permet une comparaison théorique rigoureuse des deux méthodes. Les auteurs proposent encore une évaluation de la qualité des approximations introduites dans l'une et l'autre méthode. La dernière partie du travail est consacrée à l'optimisation des divers paramètres principaux qui y interviennent, à savoir la concentration du réactif, la température et le temps de réaction.

SUMMARY

A new method is proposed for routine determinations of oxidizable and reducible substances. A mathematical development and criticism of the method of Schierjott has led to a fundamental modification of the earlier experimental

conditions (ratio of the oxidized/reduced forms of the reagent at the start and end of the redox reaction). This improvement allows a considerable increase in the sensitivity of the method and is particularly advantageous for the determination of substances of low reactivity, *e.g.* carbohydrates. Other advantages are a reduction in the quantity and thus cost of the necessary reagent, and a decreased risk of precipitation of the substances involved. The mathematical treatment of the proposed version allows a rigorous theoretical comparison of the two methods. An evaluation of the quality of the approximations introduced into both methods is also proposed, based on the calculation of the deviation (absolute and relative differences) of approximated values from theoretical values. The final part of the work deals with optimization of the different principal parameters, *i.e.* concentration of the reagent, temperature and reaction time.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Methode für die routinemässige, quantitative Analyse oxidier- oder reduzierbarer Substanzen beschrieben. Ausgehend von einer mathematischen Entwicklung und einer Kritik der Schierjott Methode werden experimentelle Bedingungen vorgeschlagen (Verhältnis oxidierte/reduzierte Form des Reagenzes zu Beginn und am Ende der Reaktion), die gegenüber derjenigen der Methode des genannten Autors eine beträchtliche Erhöhung der Empfindlichkeit erwarten lassen. Die vorgeschlagenen Konzentrationsverhältnisse wirken sich besonders günstig bei denjenigen Substanzen aus die normalerweise schwach oder langsam reagieren (z.B. Kohlhydrate). Die neue Methodik erlaubt den Einsatz geringerer Reagenzmengen—und erniedrigt somit auch den Reagenzpreis pro Analyse—und vermindert die Gefahr des Fällens der Ausgangs- oder Reaktionsprodukte. Die mathematischen Formulierungen der Redoxvorgänge in den beiden Methoden erlauben einen exakten Vergleich und eine genaue Interpretation der Resultate. Dabei werden die Genauigkeiten der in beiden Verfahren eingeführten mathematischen Approximationen in Form von Differenzen zwischen angenäherten und theoretischen Werten angegeben. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit werden die optimalen Reaktionsparameter (Konzentrationen, Temperatur, Reaktionszeit) der neuen Methode festgelegt.

BIBLIOGRAPHIE

1 G. Schierjott, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 350.
2 J. O. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, sous presse.

Analytica Chimica Acta, 68 (1973) 161–175

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam Printed in The Netherlands

NOUVELLE MÉTHODE DE DOSAGE AUTOMATIQUE DE SUBSTANCES OXYDANTES OU RÉDUCTRICES PAR POTENTIOMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE

PARTIE II. MISE AU POINT MANUELLE DU DOSAGE DU LACTOSE*

J. O. BOSSET et B. BLANC
Station Fédérale de Recherches Laitières, CH-3097 Liebefeld-Berne (Switzerland)
E. PLATTNER
Institut de Génie Chimique, Ecole Polytechnique Fédérale, CH-1025 Lausanne (Switzerland)
(Reçu le 18 mai 1973)

Pour automatiser le dosage du lactose dans un lait entier frais, on dispose —généralement après certaines opérations préliminaires (déprotéinisation)—de plusieurs critères analytiques: réactions de coloration avec des produits de condensation (furfural et dérivés)[1] ou avec des enzymes spécifiques[2], indice de réfraction[3], pouvoir rotatoire[4], pouvoir réducteur, etc. Si l'on retient ce dernier critère, très classique du reste, il existe à nouveau un choix important de méthodes[5–7], mais dont quelques-unes seulement se prêtent à l'analyse automatique dite "à flux continu"[8]. Il faut en effet écarter toutes celles qui font appel à la volumétrie, à la gravimétrie ou à toute autre opération typiquement discontinue. Il reste un très important groupe, celui des déterminations photométriques (colorimétriques, spectrophotométriques, etc.)[9,10].

Quelle que soit la substance à doser, on constate de façon générale la suprématie de ce type de mesure dans l'analyse à flux continu. Si, pour le lactose, la colorimétrie fait montre d'indéniables qualités (réponse proportionnelle à la concentration dans le domaine de Lambert–Beer, relative précision, reproductibilité et simplicité de la méthode), elle présente également certains désavantages: les solutions doivent être limpides, l'équipement doit comporter un photomètre à compensation partielle ou totale (double faisceau), etc. D'autres critères analytiques encore peu exploités jusqu'ici semblent prometteurs, vu leur simplicité et le coût modique des appareils requis; tel est le cas de la potentiométrie différentielle.

Les bases théoriques de cette nouvelle méthode ont été élaborées précédemment[11] pour le cas tout à fait général du dosage d'un réducteur quelconque (r*; o*) par un oxydant dont le couple rédox (o; r) soit défini et réversible, où:

o = forme oxydée de l'oxydant r = forme réduite de l'oxydant	liqueur "titrante" ou réactif
o* = forme oxydée du réducteur r* = forme réduite du réducteur	liqueur "titrée"

* Extrait d'une thèse de doctorat prochainement publiée sous la direction des Prof. B. Blanc et E. Plattner.

Le dosage cérimétrique des glucides[12 15], particulièrement du lactose—vu la lenteur de la cinétique d'oxydoréduction—est un exemple d'application idéal de potentiométrie différentielle, puisqu'il n'est pas nécessaire d'attendre que la réaction soit terminée. Cette étude permet de vérifier également la validité de la théorie proposée[11].

On trouve dans la littérature un certain nombre de publications proposant de doser quantitativement les sucres par réduction du cérium(IV)[16–23], mais toujours par titration conventionnelle complète (point d'équivalence). Dans cette étude d'un dosage direct, on étudiera en discontinu les paramètres principaux déjà définis (concentration en réactif, temps et température de la réaction) dans l'optique d'une transposition directe à l'analyse automatique en flux continu (type "Auto-Analyzer®" de Technicon).

THÉORIE ET PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Dans le lait de vache frais, on ne trouve pratiquement qu'un seul glucide: le lactose, un diholoside réducteur (4-0-β-*d*-galactopyranosyle-*d*-glucopyranose). Les autres glucides n'existant qu'en quantités minimes (*ca.* 2% de l'ensemble des sucres), il est possible d'utiliser pour le doser en grandes séries des méthodes qui ne lui sont pas forcément spécifiques. Sa grande solubilité dans l'eau (216 g l^{-1} à 25°) fait qu'il se trouve entièrement dissous dans le lait. Son faible poids moléculaire (360.3 sous forme monohydratée) et ses très faibles dimensions permettent de le séparer facilement et de plusieurs manières—notamment par dialyse—des autres composés principaux du lait (protéines) qui peuvent interférer lors de son dosage.

La méthode proposée est basée sur la mesure potentiométrique du "pouvoir réducteur" de ce glucide. Il en résulte qu'elle est applicable de manière générale à tous les autres glucides "réducteurs", mais ne peut les différencier. Par "pouvoir réducteur", il ne faut pas seulement considérer celui de leur fonction carbonyle, mais également celui de leurs fonctions hydroxyles, puisque l'oxydant choisi pour cette méthode, le sulfate cérique, est capable d'oxyder complétement la molécule en acide formique et en anhydride carbonique.

L'oxydation du lactose étant irréversible, il n'est pas possible de suivre son évolution par la mesure directe du potentiel d'oxydoréduction du couple fictif "lactose oxydé/lactose réduit". Par contre, dans un système formé de lactose (réducteur) et de cérium(IV) (oxydant), il est aisé de suivre l'évolution de cette oxydation en déterminant la variation de la concentration de l'oxydant engagé, par la mesure au cours du temps du potentiel rédox du couple réversible Ce^{4+}/Ce^{3+}. La réaction globale d'oxydoréduction de ce système est vraisemblablement la suivante[24]:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 13\ H_2O - 26\ e^- \rightarrow 11\ HCOOH + CO_2 + 26\ H^+ \quad (1)$$

$$26\ Ce^{4+} + 26\ e^- \rightarrow 26\ Ce^{3+} \quad (2)$$

L'oxydation globale définie par l'éqn. (1) ne peut se réaliser en une seule étape, mais est l'aboutissement d'une importante chaîne d'oxydations partielles. Il est éventuellement possible d'en imaginer quelques-unes par analogie avec ce que l'on trouve dans la littérature pour d'autres oxydants[25]. Si l'on considère le cas du glucose, en tant que sous-unité de structure du lactose, on a pu identifier les réactions "ménagées" suivantes: avec l'eau de brome à température ordinaire, on

obtient un monoacide aldonique, l'acide *d*-gluconique; avec l'acide nitrique ($d = 1.31$) à froid, un monoacide cétoaldonique, l'acide céto-5-*d*-gluconique; avec le même acide ($d = 1.2$) à chaud, un diacide, l'acide *d*-saccharique, etc.

En outre, d'autres facteurs jouent un rôle important dans ce processus d'oxydoréduction, notamment le pH. Si H^+ n'apparaît pas dans le couple rédox Ce^{4+}/Ce^{3+}, il intervient par contre de façon extrêmement complexe dans le mécanisme même de l'oxydation du lactose, ce qu'indique déjà l'éqn. (1). Une publication traitant la cinétique d'une oxydation pourtant beaucoup plus simple, celle de l'acétone par le sulfacte cérique en milieu sulfurique[26], ne mentionne pas moins de 6 étapes dépendant du pH. Ce dernier influence encore les nombreux équilibres et produits de solubilité des divers composés engagés ou formés.

En l'absence même de tout agent oxydant, le lactose donne lieu à toute une série de réactions en milieu acide, surtout à chaud[27]. D'abord, il est hydrolysé en deux monoholosides, le *d*-glucose et le *d*-galactose. A leur tour, ces hexoses se transforment en 5-hydroxyméthylfurfurol. Une exposition plus longue aux acides chauds conduit ensuite à la formation d'acides lévulique et formique, ou à la formation de produits de condensation insolubles de couleurs sombres, connus sous le nom d'acides humiques.

Puisque la réaction globale fait appel à une chaîne d'oxydations partielles consécutives, on en déduit que le nombre d'équivalents de réducteur, ψ, que fournit une mole de lactose varie continuellement pendant le temps de réaction et doit s'écrire:

$$\Delta r^{*\,i}_{\ j} = \Delta(\psi[\text{ose}])^i_j \qquad (3)$$

où $\Delta r^{*\,i}_{\ j}$ est la consommation de la forme réduite du réducteur pendant le laps de temps considéré (instant i–instant j).

Si la réaction est complète selon l'éqn. (1), $\psi = 26$.

MODE OPÉRATOIRE ET APPAREILLAGE

Le mode opératoire consiste à injecter rapidement au temps i (choisi comme origine du temps) un volume donné d'une solution de lactose de concentration connue $[\text{ose}]_i$ dans un volume donné d'un mélange de sulfates cérique et céreux de concentrations initiales $[Ce^{4+}]_i$ et $[Ce^{3+}]_i$, dissous dans l'acide sulfurique 0.5 *M* (dans tous les essais qui suivent, la concentration en sulfate céreux, à l'origine, est donnée par la teneur usuelle ou "impureté" du réactif pro analysi utilisé). La Figure 1 indique comment évolue le potentiel d'oxydoréduction $E_{\text{rédox}}$ de ce couple en fonction du temps de réaction t (j est un point quelconque où est supposée se situer la seconde électrode de mesure dans un système en flux continu). Si la réaction est terminée, $j \equiv f$.

Les essais ont été réalisés au moyen d'un équipement Metrohm: un potentiographe E 436, équipé d'un réducteur de vitesse d'enregistrement US-320-18, et d'une cellule EA 880 T-20 ml, montée sur l'agitateur magnétique correspondant et couplée à un thermostat à circulation Lauda WB20D. Le $\Delta E_{\text{rédox}} = E_{\text{rédox}} - E_{\text{réf}}$ est mesuré par une électrode combinée (Pt–Ag/AgCl) EA 217, supportant des températures supérieures à 60°, sous atmosphère inerte (N_2) injectée par un barboteur EA 649. La température est contrôlée par un thermomètre EA 623.

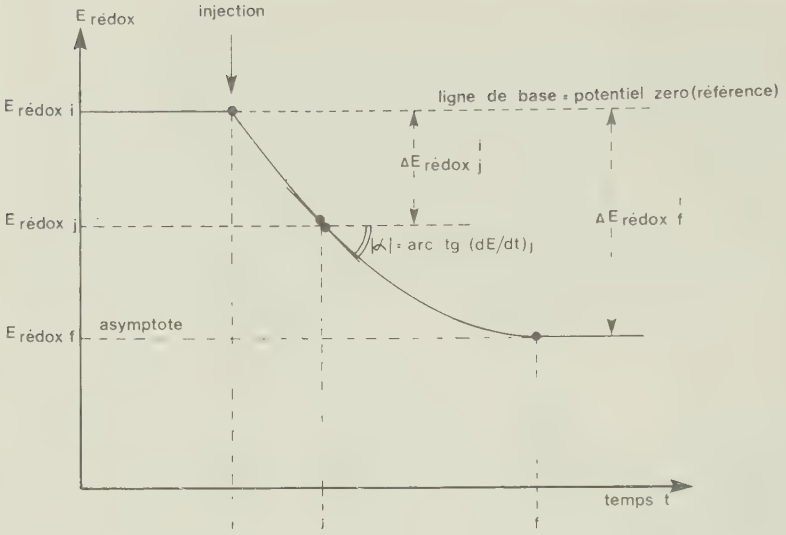


Fig. 1. Evolution du potentiel d'oxydoréduction $E_{rédox}$ du couple Ce^{4+}/Ce^{3+} en fonction du temps de réaction t avec le lactose.

Afin d'éviter toute interférence éventuelle due à quelque autre substance réductrice, la mise au point de cette méthode a été opérée avec des solutions aqueuses ne contenant que du lactose.

Produits utilisés étaient lactose (monohydraté, LAB de Merck, art. 7660), sulfate cérique (tétrahydraté, p.A. de Merck, Art. 2274), et acide sulfurique (p.A de Merck, Art. 731) dilué à 0.5 *M*.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET INTERPRÉTATION

Détermination du rapport Ce^{3+}/Ce^{4+} pour le réactif utilisé

La teneur en "impureté" (forme réduite de l'oxydant), définie comme le rapport $K = r_i/o_i = [Ce^{3+}]_i\,[Ce^{4+}]_i$ du réactif utilisé, a été déterminée par la mesure du potentiel rédox (relation de Nernst) du réactif seul:

$$E_{\text{rédox } i} = E_{0\,\text{rédox}} + (RT/F)\ln(o_i/r_i) = E_{0\,\text{rédox}} - (RT/F)\cdot\ln K \qquad (4)$$

Une mesure supplémentaire, avec la même électrode combinée, effectuée dans une solution équimolaire en forme oxydée et réduite ($o_i = r_i$), permet d'éliminer par différence le potentiel rédox normal E_0 et le potentiel de référence $E_{réf}$. La différence de potentiel existant entre ces deux mesures devient alors:

$$\Delta E = (RT/F)\ln(o_i/r_i) = 59.2\cdot\log_{10}([Ce^{4+}]_i/[Ce^{3+}]_i) = 126.5\ (\text{mV}) \qquad (5)$$

(Calcul effectué pour $T = 25$; moyenne de 9 mesures; valeurs extrêmes obtenues: $121\ (\text{mV}) < \Delta E < 132\ (\text{mV})$.)

Il est alors possible de déduire la valeur de K:

$$K = [Ce^{3+}]_i/[Ce^{4+}]_i = -\text{antilog}_{10}(126.5/59.2) = 7.3\cdot10^{-3} \qquad (6)$$

(valeurs extrêmes: $6\cdot10^{-3} < K < 9\cdot10^{-3}$)

Influence de la concentration du réactif et du temps de réaction

La vérification expérimentale du développement théorique mentionné[11] a été effectuée comme suit: à une température fixée à 85 . on injecte 1 ml d'une solution de lactose à 5 g l^{-1}, soit 14 méq l^{-1} si l'on considère l'oxydation comme complète pour $\psi = 26$, dans 25 ml de solution sulfurique (0.5 *M*) de Ce^{4+} dont la concentration est échelonnée pour les différents essais entre $4 \cdot 10^{-2}$ et $5 \cdot 10^{+2}$ mmol l^{-1} (ou méq l^{-1}).

Le potentiographe est réglé comme suit: compensation = 1200 mV; zéro électrique = flottant; expansion d'échelle = 1 mV mm^{-1}; vitesse d'enregistrement = 5 (*ca.* 16.5 mm min^{-1}). Les graphes des Figs. 2 et 3 montrent l'évolution du potentiel rédox $E_{rédox}$ en fonction:

du temps de réaction pour diverses concentrations en $[Ce^{4+}]_i$ (Fig. 2);

de la concentration en oxydant engagé $[Ce^{4+}]_i$ pour différents temps de mesure *j* (Fig. 3).

Puisque c'est la mesure différentielle $\Delta E_{rédox}{}^{i}_{j}$ que l'on recherche, on admettra arbitrairement, pour chacun des graphes, que $E_{rédox\,i} \equiv 0$ (translations du système d'axes). Le tracé de l'enregistreur correspondant à cette dernière valeur de $E_{rédox}$ définit la "ligne de base" du graphe.

Comme l'indiqué dans l'étude théorique[11], l'étude de la concentration du réactif se ramène à l'étude du quotient:

$$Q = o_i/\Delta r^*{}^{i}_{j} = [Ce^{4+}]_i/\Delta(\psi[ose])^{i}_{j}$$

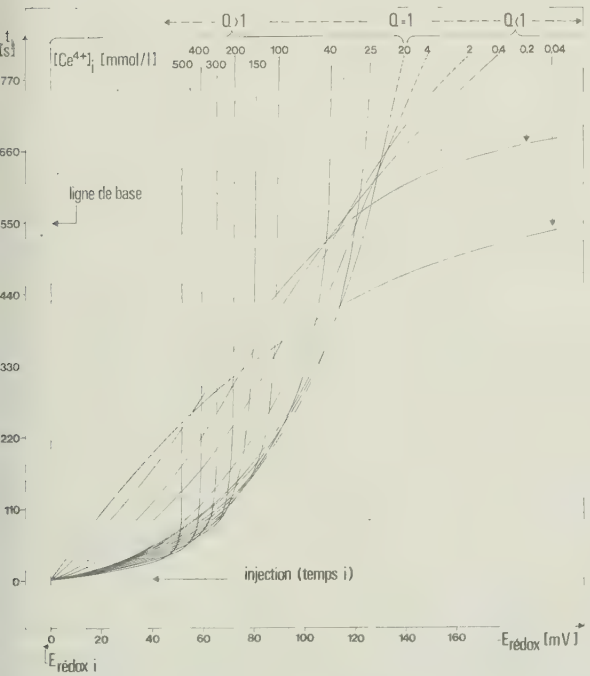


Fig. 2. Influence du temps de réaction *t* sur le potentiel $E_{rédox}$ pour diverses concentrations initiales de l'oxydant $[Ce^{4+}]_i$ (85°).

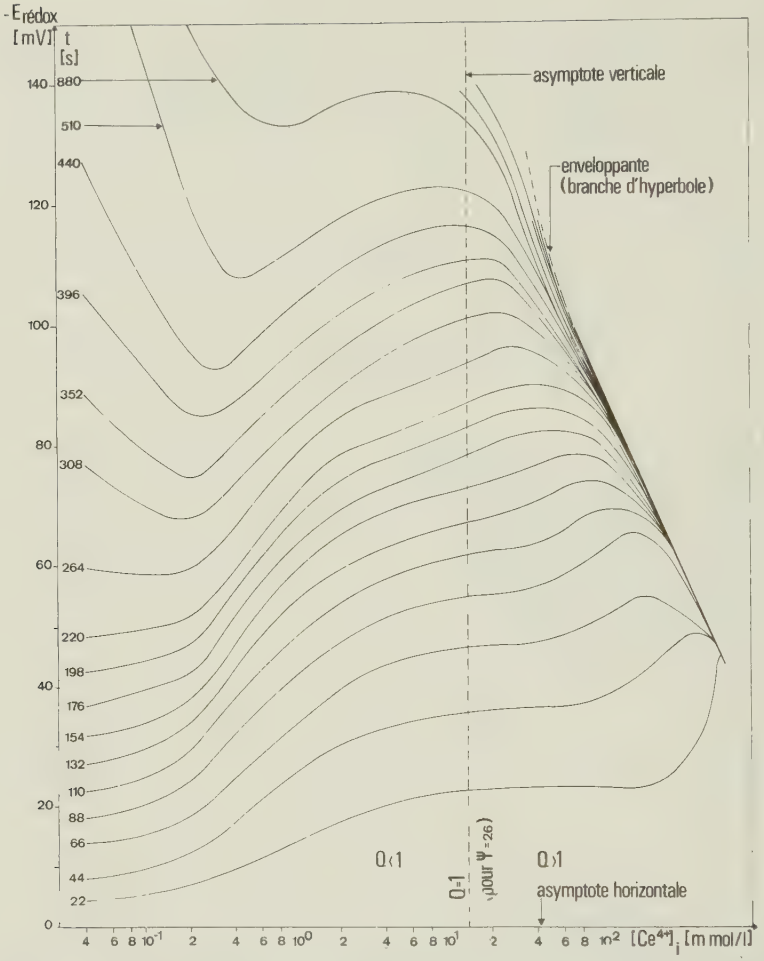


Fig. 3. Influence de la concentration initiale de l'oxydant $[Ce^{4+}]_i$ sur le potentiel $E_{rédox}$ pour différents temps de réaction t (85°).

c'est à dire du rapport entre l'oxydant engagé et la consommation du réducteur entre les instants i et j. Pour simplifier la discussion, on utilisera par la suite le terme de "réactif" pour désigner l'oxydant (Ce^{4+}) avec sa teneur en "impureté" (Ce^{3+}).

La forme générale des divers graphes de la Fig. 2 amène à la conclusion suivante, en accord avec la théorie.

Lorsque $Q > 1$, les graphes de $E_{rédox}$ en fonction du temps -après un tracé initial décrivant un point anguleux au moment de l'injection du lactose—s'infléchissent progressivement en tendant asymptotiquement vers l'équilibre (f). Ce dernier est atteint d'autant plus rapidement (*cf.* les pentes des tangentes peu après l'injection $[dE/dt]_j$) et avec un $\Delta E_{rédox\,j}^{\,i}$ d'autant plus petit que Q est grand.

Lorsque $Q < 1$, ces mêmes graphes présentent des formes totalement différentes. Si le début de la courbe peut rappeler celui obtenu pour $Q > 1$, à concavité tournée vers les potentiels positifs croissants (excès momentané, apparent), ce

graphes passent ensuite par un point d'inflexion, leur concavité étant tournée—en fin de réaction—du côté opposé. La dérive de $E_{\text{rédox}}$ vers les potentiels négatifs est d'autant plus grande et plus rapide que $Q \to 0$. Il n'y a plus de stabilisation possible, le couple Ce^{4+}/Ce^{3+} n'étant plus défini.

Lorsque $Q = 1$, le graphe présente une allure intermédiaire. Ce qui a été vu pour l'un et l'autre cas précédents doit encore être vrai "à la limite" (excès ou défaut de réactif tendant vers un). Il faudrait théoriquement un temps infini pour atteindre l'équilibre ($f = \infty$).

En conclusion, il est nécessaire de travailler avec $Q > 1$, afin que $E_{\text{rédox}}$ soit contrôlé par le couple Ce^{4+}/Ce^{3+}; cet excès ne doit cependant pas être trop gros pour éviter une inutile perte de sensibilité de la méthode, $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{f} \to 0$ lorsque $[Ce^{4+}]_i \to \infty$. En ce qui concerne le temps de réaction, il faut le choisir aussi grand que possible, $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ croissant lorsque $j \to f$.

La forme générale des divers graphes de la Fig. 3, montrant l'évolution de $E_{\text{rédox}}$ en fonction de $[Ce^{4+}]_i$ engagé, à divers instants de la réaction (courbes isochrones), permet de confirmer et compléter les informations précédentes.

Lorsque $j \to f$, le faisceau des courbes isochrones tend vers une courbe limite, son enveloppante. Ce lieu géométrique des $E_{\text{rédox}\,f}$ ou $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{f}$ n'est autre que l'une des branches de l'hyperbole définie par la relation théorique[11]:

$$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{f} = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{KQ+1}{KQ-\mathrm{K}} \tag{8}$$

L'autre branche de l'hyperbole n'a pas de signification physique. L'asymptote verticale correspond à $Q = 1$, l'asymptote horizontale, à $Q = \infty$.

Chaque courbe isochrone montre un maximum et un minimum, dus à la compétition de deux effets opposés. Pour le maximum, il s'agit de la compétition existant entre la vitesse de réaction (d'autant plus grande que $Q \to \infty$) et la sensibilité ou $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ (d'autant plus faible que $Q \to \infty$). Pour le minimum, il s'agit de celle existant entre la vitesse de réaction (idem) et la vitesse de disparition du Ce^{4+} (d'autant plus grande que $Q \to 0$). Tous les minima se situent donc en dessous de la stoechiométrie ($Q = 1$). Lorsque $j \to f$, le lieu géométrique des minima et celui des maxima converge vers le point à l'infini de l'asymptote verticale que définit la réaction stoechiométrique ($\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} \to \infty$ quand $j \to f = \infty$).

Dans un certain domaine de concentration en $[Ce^{4+}]_i$ ($Q > 1$), on remarque que $E_{\text{rédox}\,f}$ (ou $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{f}$) est inversément proportionnel, à une constante additive près, au logarithme de la concentration du réactif pour une quantité donnée de lactose. Inversément, pour des concentrations initiales en Ce^{4+} et Ce^{3+} constantes, le $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{f}$ sera proportionnel à une constante additive près, à $\ln(\psi[\text{ose}])$. Ce point sera repris plus loin. Ainsi se trouve confirmée la relation établie au cours de l'étude théorique[11]:

$$\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j} = K^{\text{II}} \ln \Delta r^{*}{}^{i}_{j} + K^{\text{III}} \tag{9}$$

Pour $[Ce^{4+}]_i > 50$ mmol l^{-1}, il faut néanmoins signaler, après un certain temps de réaction, la formation d'un précipité jaune, ce qui indique que l'un des produits de solubilité a été dépassé; cela peut expliquer la différence existant entre les $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$ mesurés et ceux que l'on trouve par le calcul.

Au-dessous d'une certaine valeur de Q, l'approximation proposée (identification de l'hyperbole à une droite sur un certain segment) n'est plus possible, l'écart existant entre la valeur exacte et la valeur approchée devenant trop important. C'est le "seuil supérieur de linéarité" (trop de lactose engagé pour l'oxydant présent).

N.B. La fonction $E_{\text{rédox}} = f(t)$ est monotone décroissante, toujours négative, puisqu'il s'agit d'une réduction de Ce^{4+}, dont le potentiel de référence est celui du réactif initial, identiquement nul par définition ($E_{\text{rédox } i} \equiv 0$).

Influence de la température

Sur la base de l'essai précédent, l'influence de la température T a été étudiée de la manière suivante: 1 ml d'une solution de lactose à 5 g l^{-1} (0.5%) est injecté dans 25 ml d'une solution 20 mmol l^{-1} de sulfate cérique en milieu sulfurique 0.5 *M*. L'essai est répété à diverses températures comprises entre 20 et 90 . Le potentiographe est réglé comme précédemment. Les résultats obtenus sont présentés par les graphes de la Fig. 4.

En convenant à nouveau de considérer chaque ligne de base comme potentiel de référence, c'est à dire chaque $E_{\text{rédox } i} \equiv 0$, quel que soit son potentiel absolu, on

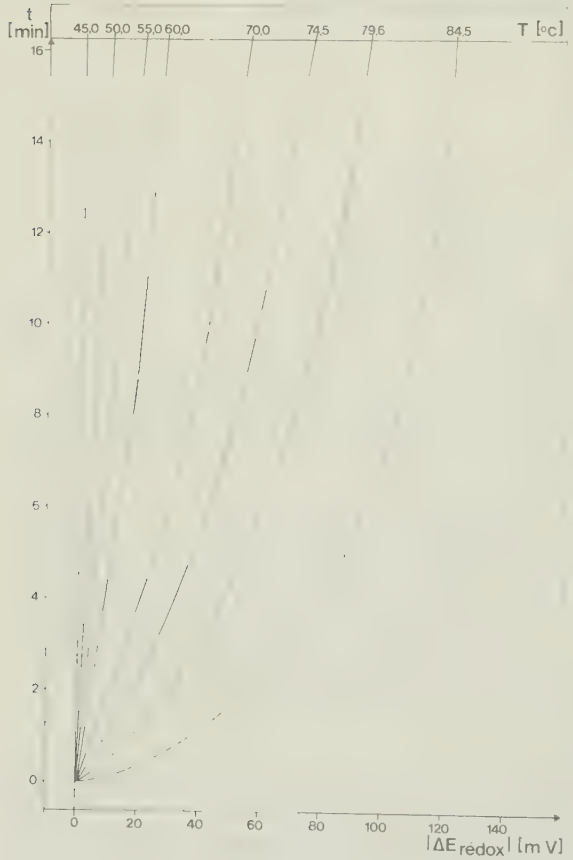


Fig. 4. Influence du temps de réaction t sur $\Delta E_{\text{rédox}}$ pour différentes températures T ($[Ce^{4+}]_i = 20$ mmol l^{-1}).

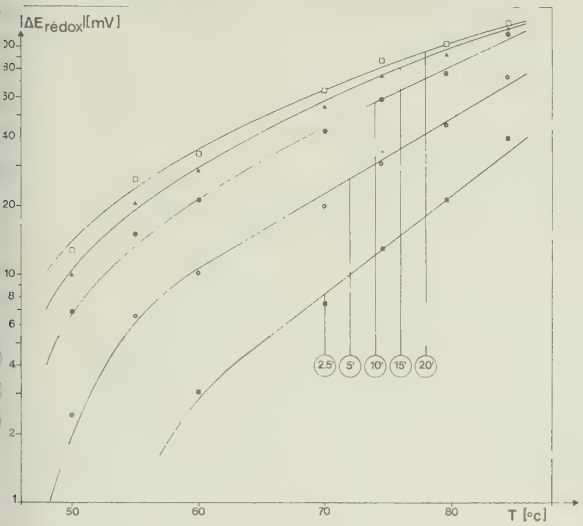


Fig. 5. Influence de la température de réaction T sur la différence de potentiel $\Delta E_{\text{rédox}}$ mesurée entre le début de la réaction et l'instant j (à savoir: $t=2.5$, 5, 10, 15 et 20 min).

remarque que la température augmente considérablement le signal $|\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}|$ ou $|E_{\text{rédox}\,j}|$ obtenu, ce que prévoyait la théorie. Au-dessous de 40°, la réaction n'a pratiquement pas lieu. Au-dessus de 55° environ, $E_{\text{rédox}}$ varie à peu près exponentiellement avec la température, comme le montre la Fig. 5 (énergie d'activation minimale pour que la première réaction rédox au moins puisse se produire).

Essai d'application: courbe d'étalonnage

Sur la base des données acquises, un essai d'application a été effectué sous la forme d'une courbe d'étalonnage: à 25 ml d'une solution de sulfate cérique en milieu sulfurique 0.5 M, on ajoute rapidement 1 ml d'une solution de lactose dont la concentration varie, pour les divers essais, de 10^{-1} à 10^{1} g l^{-1}. Les conditions expérimentales retenues sont: $T=85°$; $[Ce^{4+}]_i=20$ mmol l^{-1}; $K=7.3\cdot10^{-3}$; $[Ce^{4+}]_i\cong0.15$ mmol l^{-1}. Le potentiographe est réglé comme avant, sauf pour la vitesse d'enregistrement qui est un peu plus rapide (voir Fig. 6a). Les résultats obtenus pour les temps $j=45$, 90, 135 et 180 s (t_f non atteint) sont représentés par les graphes de la Fig. 6b.

Reprenant ces valeurs, le Tableau I analyse dans quel domaine de concentration en lactose et dans quelle mesure (coefficient de corrélation) la relation (9) est vérifiée par l'expérience.

L'expérience confirme la proportionnalité existant dans un certain domaine de concentration, entre la différence des potentiels rédox de la solution à deux instants donnés de la même réaction et le logarithme de la teneur en réducteur (lactose) de l'échantillon. Comme prévu théoriquement, il existe aussi pour des concentrations données en Ce^{4+} et en Ce^{3+}, un "seuil inférieur de linéarité" (trop peu de lactose engagé pour le réactif présent), au-dessous duquel l'approximation proposée n'est plus valable.

On constate en effet que lorsque $[ose]\to0$, c'est à dire que $\ln[ose]\to-\infty$,

$|\Delta E_{\text{rédox}}| \to 0$ (asymptote horizontale) et non vers $-\infty$, ce qui serait le cas si la proportionnalité n'était pas bornée inférieurement (*cf.* Fig. 6b).

En ce qui concerne la double inégalité:

$$r_i \ll \Delta r^*{}_j^i \ll o_i \text{ (réf. 1), c'est à dire } [Ce^{3+}]_i \ll \Delta(\psi[\text{ose}])_i^i \ll [Ce^{4+}]_i \qquad (10)$$

il est extrêmement difficile de déterminer dans quelle mesure cette dernière est respectée, le coefficient ψ étant inconnu ($\psi < 26$, puisque f n'est pas atteint).

TABLEAU 1

VÉRIFICATION DE LA VALIDITÉ DE LA RELATION APPROCHÉE[a]:

$\Delta E_{\text{rédox}}{}_j^i = K^{II} \ln \Delta r^*{}_j^i + K^{III}$

Domaine de concentration en lactose considéré		*Valeur de j*	*Droite de régression*			
(g l^{-1})[b]	*(mmol l^{-1})*[c]	*(s)*	K^{II}	K^{III}	R[d]	N[e]
2.0[f]–10.0	0.21–1.07	45	18.30	−33.49	0.99322	10
1.5[f]–10.0	0.16–1.07	90	23.09	−34.03	0.99745	11
1.0[f]–10.0	0.11–1.07	135	25.43	−30.07	0.99871	12
0.5[f]–10.0	0.05–1.07	180	26.16	−22.05	0.99837	13

[a] Conditions: $T = 85$; $[Ce^{4+}]_i = 20$ mmol l^{-1}; $[Ce^{3+}]_i = 0.15$ mmol l^{-1}.
[b] Concentration de la solution de lactose *injectée*, exprimée en g l^{-1} (sans tenir compte du volume du réactif).
[c] Concentration de la solution *finale* en lactose, exprimée en mmol l^{-1} (en tenant compte du volume total, mais pas du coefficient ψ).
[d] R = coefficient de corrélation.
[e] N = nombre de points considérés dans le calcul (population statistique).
[f] Seuil inférieur du domaine de proportionnalité étudié.

Le Tableau 1 et la Fig. 6 confirment numériquement ce que les essais antérieurs ont déjà indiqué, notamment qu'il est intéressant d'attendre que la réaction soit aussi complète que possible, puisque lorsque $j \to f$, on observe:

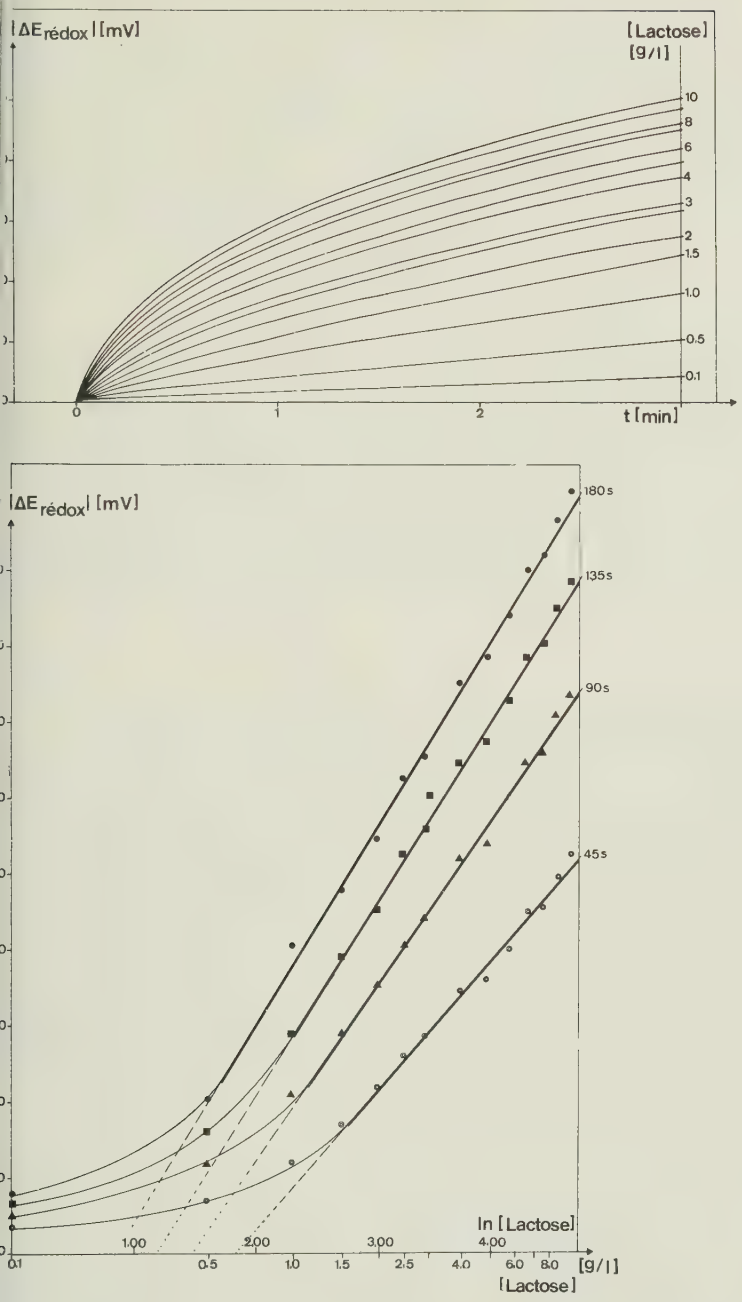
un accroissement de la sensibilité analytique (les pentes K^{II} des droites de régression croissent avec le temps);

un abaissement du "seuil inférieur de linéarité", c'est à dire de la concentration minimum nécessaire en lactose, sans pour autant diminuer la qualité de cette proportionnalité (le coefficient de corrélation R tend vers 1 avec le temps). La raison en est vraisemblablement la suivante: puisque le coefficient ψ augmente avec le temps, la grandeur $\Delta(\psi[\text{ose}])_j^i$ croît pendant la réaction; la première inégalité de la relation (10) ($r_i \ll \Delta r^*{}_j^i$) n'en est que mieux respectée;

une diminution de l'erreur relative entachant la mesure de $\Delta E_{\text{rédox}}{}_j^i$ pour une valeur de j donnée, les diverses courbes tendant asymptotiquement vers leur valeur définitive.

Spécificité de la méthode

Toutes les substances capables de réduire le cérium(IV) dans les conditions



ig. 6 (a) et (b). Variation de $\Delta E_{\text{rédox}}$ en fonction du temps de réaction et de la concentration en lactose.

hoisies vont réagir. La méthode n'est donc pas spécifique et nécessite l'élimination réliminaire de ces dernières. Dans le lait, seules les protéines gênent effectivement le osage du lactose par cette méthode, puisque leurs fonctions –SH, –S–S– et –OH

principalement réagissent. Les essais préliminaires ont montré qu'il s'agit surtout des restes cystyles, cystéyles, méthionyles, hydroxyprolyles, séryles, thréonyles et tyrosyles. Dans un analyseur à flux continu, on peut les éliminer par une simple dialyse. La matière grasse du lait devrait aussi intervenir, mais les réactions obtenues sont peu caractéristiques (lentes et faibles)[16].

Pour être rigoureux, il faut encore mentionner les réactions rédox qui peuvent se produire avec les halogénures, les vitamines C et E, etc. Mais la concentration de ces éléments mineurs dans le lait de vache est suffisamment faible comparativement à celle du lactose pour qu'on puisse la négliger ou la considérer comme constante quant à son effet sur le $\Delta E_{\text{rédox}}$.

Conclusion

La potentiométrie différentielle s'avère être une méthode intéressante pour la détermination quantitative du lactose. Le modèle mathématique proposé dans l'étude théorique[11] semble être entièrement vérifié par l'expérience, bien que la valeur du coefficient ψ ne soit qu'imparfaitement connue en raison de son évolution constante au cours de la réaction. Le $\Delta E_{\text{rédox}}{}^{i}_{j}$, mesuré entre deux *instants* donnés dans la méthode manuelle, sera mesuré entre deux *points* donnés du système automatique à flux continu. Les essais de mise au point de la méthode, réalisés sur des solutions ne contenant que du lactose, permettent de fixer la valeur des principaux paramètres définis:

$K = r_i/o_i = [Ce^{3+}]_i/[Ce^{4+}]_i$: aussi faible que possible, non nulle: la valeur de K du produit utilisé est suffisante ($K = 0.007$);

T = température de la réaction: aussi élevée que possible (85° à 95° pour des raisons pratiques);

Δt = intervalle de temps entre les mesures initiale et finale ou temps de réaction: aussi grand que possible, même si la cinétique décroît avec t (5–10 min);

$Q = o_{i/} \Delta r^{*}{}^{i}_{j} = [Ce^{4+}]_i \; \Delta(\psi [\text{lactose}]^{i}_{j} \geqslant 1$: un accroissement de Q augmente la cinétique, mais diminue la sensibilité. Comme l'indique le développement théorique[11], la qualité de l'approximation proposée (courbe hyperbolique ≅ courbe linéaire sur un certain segment) est également fonction de Q; Q est encore limité par les produits de solubilité des divers constituants présents.

Les essais complémentaires ont montré que les protéines réagissent également: il est donc nécessaire de les éliminer au préalable: manuellement, par une déprotéinisation classique à l'acide trichloroacétique, ou en flux continu, par une dialyse.

Remarques. La mise au point de cette nouvelle méthode a été réalisée au moyen d'un potentiographe pour des raisons de commodité; il n'est pourtant pas nécessaire de posséder un instrument de cette classe: n'importe quel bon pH-mètre ou potentiomètre couplé à un enregistreur suffit.

Destinée à être automatisée, cette méthode n'a pas fait l'objet de tests statistiques particuliers au niveau de l'expérimentation manuelle. Un essai de reproductibilité a néanmoins montré que sur 11 déterminations d'un même échantillon, seules les deux premières s'écartent de plus de $\pm 2\%$ relatifs de la valeur moyenne. On peut en conclure que la méthode est très reproductible, mais que le mode d'injection de l'échantillon joue un rôle capital.

Le cérium(IV) étant jaune et le cérium(III), incolore[28], on pourrait utiliser

la même réaction d'oxydoréduction pour doser le lactose par une colorimétrie classique en flux continu.

Le choix de l'oxydant à engager est dicté par plusieurs raisons, dont les principales sont la réversibilité (forme oxydée⇄forme réduite), le pouvoir oxydant ($E_{0\,\text{rédox}}$ élevé), la stabilité (non volatil et stable à l'air), la solubilité et la pureté (K). Le cérium présente en outre l'avantage de n'avoir que deux degrés d'oxydation (sous forme ionique) bien définis[28].

Autres possibilités d'utilisation de la méthode

Le champ d'application de cette nouvelle méthode ne paraît pas se limiter à la seule détermination quantitative du lactose. En supprimant la dialyse prévue pour l'analyse en flux continu et choisissant une température de réaction un peu moins élevée pour empêcher tout à fait la matière grasse de réagir, on peut garder la même méthode pour doser directement la teneur en solides non gras ("non-fat-solids") du lait entier frais, comme l'indiquent certains travaux analogues[29,30], mais recourant aux titrations manuelles conventionnelles.

Dans un domaine voisin, celui de la chimie clinique, la méthode proposée devrait également permettre le dosage automatique des glucides (réducteurs) du sérum sanguin, en adoptant d'autres concentrations.

RÉSUMÉ

Le présent travail propose une nouvelle méthode de dosage cérimétrique du lactose dans le lait entier frais. Dans des conditions de réaction bien définies et reproductibles, on considère les rapports de concentrations Ce(IV)/Ce(III) à deux instants donnés de la même réaction d'oxydoréduction. L'expérience montre que, dans un certain domaine de concentration, la différence des potentiels de Nernst correspondants est proportionnelle, à une constante additive près, au logarithme de la concentration en lactose présent. Les divers paramètres caractérisant cette réaction (température, temps, pH, rapport des concentrations) sont étudiés systématiquement dans le but de les optimiser. Les résultats expérimentaux obtenus confirment le modèle théorique général proposé antérieurement pour les dosages par potentiométrie différentielle. Après dialyse en flux continu, la méthode est applicable directement à l'analyse automatique en flux continu.

SUMMARY

A new cerimetric method is proposed for the determination of lactose in whole fresh milk. Under well defined and reproducible reaction conditions, the Ce(IV)/Ce(III) concentration ratio is considered at two given instants of the same redox reaction. In a given concentration range, the difference in the corresponding Nernst potential is proportional (plus a fixed constant) to the logarithm of the lactose concentration. The various parameters characterising the reaction (temperature, time, pH, concentration ratio) are systematically studied in order to establish optimal conditions. The experimental results obtained confirm the general theoretical model proposed earlier for measurement of substances by differential potentiometry.

After dialysis in continuous flow, the method is directly applicable to automatic continuous flow analysis.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue cerimetrische Methode zur quantitativen Lactosebestimmung in frischer Vollmilch beschrieben. Das Prinzip der Methode beruht auf der Ermittlung des Ce(IV)/Ce(III)-Konzentrationsverhältnisses an zwei bestimmten Punkten der Redoxreaktion, die unter genau definierten und reproduzierbaren Bedingungen abläuft. Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Differenz der zwei entsprechenden Nernstpotentiale in einem gewissen Konzentrationsbereich bis auf eine zu addierende Konstante, dem Logarithmus der Lactosekonzentration procortional ist. Die Reaktionsparameter (Temperatur, Zeit, pH, Konzentrationsverhältnisse) wurden im Hinblick auf die Ermittlung optimaler Bedingungen systematisch untersucht. Die experimentellen Ergebnisse bestätigen unsere früher vorgeschlagen theoretischen Modellvorstellungen über die Reaktionsabläufe bei der Differential-Potentiometrie. Die beschriebene Methode kann, wenn ein kontinuierlich arbeitendes Dialyse-System vorgeschaltet wird, direkt für Durchfluss-Analysenautomaten verwendet werden.

BIBLIOGRAPHIE

1 A. J. Lawrence, *Aust. J. Dairy Technol.*, 23 (2) (1968) 103.
2 G. Kurz et K. Wallenfels, dans H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim, 1970, p. 1147–1151.
3 A. Beckel, *Z. Unters. Lebensm.*, 64 (1932) 130.
4 *Methods of Analysis of the A.O.A.C.*, 1960, Official method no. 15026.
5 K. G. Sloman, A. K. Foltz et J. A. Yeranstan, *Anal. Chem.*, 41 (5) (1969) 66R.
6 *International Standard FIL-IDF 28*, 1964.
7 *Schweiz, Lebensmittelbuch*, Bd. I, 5. Aufl., 1964, pp. 559–570.
8 K. W. Fuller, *Technicon Symposia, Automation in Analytical Chemistry, 1966*, Vol. II, 1966, pp. 57–61.
9 A. Conneta, L. Stookey et H. Zehnder, *Technicon Int. Congr. on Advances in Automated Analysis, 1970*, Vol. II, 1970, pp. 81–85.
10 L. Velluz, *Pratique de l'Analyse Organique Colorimétrique*, Masson, Paris, 1966, pp. 213–216.
11 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 67 (1973) 403.
12 P. Pascal, *Traité de Chimie Minérale*, Tome VIII, Masson, Paris, 1933, pp. 188–191.
13 G. Lejeune, *J. Chim. Phys.*, 24 (1927) 482.
14 A. K. Goard et E. K. Rideal, *Proc. Roy. Soc. A*, 105 (1924) 135.
15 G. Birstein et M. Blumental, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 11 (1944) 573.
16 T. L. Lunder, *Lait*, 50 (498) (1970) 483.
17 A. H. Best, A. H. Peterson et H. M. Sell, *Ind. Eng. Chem.*, 14 (2) (1942) 145.
18 R. Vanossi et R. Ferramola, *An. Soc. Cient. Argent.*, 121 (1936) 59.
19 W. Z. Hassid, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 9 (1937) 228.
20 C. S. Sudheendranath, D. Sethu Rao et C. P. Anantakrishnan, *Indian J. Dairy Sci.*, 14 (1963) 41.
21 D. Sethu Rao, C. S. Sudheendranath, D. S. Krishna Rao, M. Bhimasena Rao et C. P. Anantakrishnan, *Indian J. Dairy Sci.*, 17 (1964) 91.
22 A. A. Forist et J. C. Speck, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1166.
23 G. F. Smith and F. R. Duke, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13 (1941) 558; 15 (1943) 120.
24 N. N. Sharma, *Anal. Chim. Acta*, 14 (1956) 423; *Z. Anal. Chem.*, 154 (1957) 340.
25 V. Hasenfratz et M. Frerejacque, dans V. Grignard, G. Dupont et R. Locquin, *Traité de Chimie Organique, Vol. VIII*, Masson, Paris, 1938, pp. 241–243, 262 et 519.
26 J. Shorter et C. Hinshelwood, *J. Chem. Soc. (London)*, (1950) 3276, 3425.

H. L. Greenhaus, A. M. Feibush et L. Gordon, *Anal. Chem.*, 29 (10) (1957) 1531.
E. Wadsworth, F. R. Duke et C. A. Goetz, *Anal. Chem.*, 29 (12) (1957) 1824.
D. Sethu Rao, C. S. Sudheendranath, S. Krishna Rao, M. Bhimasena Rao et C. P. Ananiakrishnan, *Indian J. Dairy Sci.*, 18 (1965) 31.
A. G. Leggatt, *Can. Dairy and Ice-Cream J.*, 33 (4) (1954) 36, 70.

de plus la cadence d'analyse de l'appareil puisqu'on diminue les temps de rinçage de l'installation.

Inversément, une petite vitesse de pompage, c'est à dire un temps de séjour prolongé dans la spirale de réaction, augmente le nombre d'équivalents de réducteur fournis par une mole de lactose: la sensibilité de la méthode croît. A signal égal, on peut donc diminuer l'expansion d'échelle. Cette seconde condition est cependant moins impérative que la première, puisqu'une élévation de température permet de compenser largement la perte de sensibilité due à un pompage rapide: on a donc finalement opté pour l'emploi de la vitesse de pompage la plus élevée (rapport = 10) pour la suite des essais.

Température de réaction. Comme l'indique le paragraphe précédent, la température T joue un rôle considérable[2], plus important même que le temps de réaction, influençant de plusieurs manières le dosage (d'où la nécessité d'un contrôle précis de ce paramètre). Du point de vue réactionnel, il vaut la peine de travailler avec T aussi élevée que possible, comme l'indique le Tableau I. Pour cet essai, le réactif est une solution de sulfate cérique à 20 mM, en milieu sulfurique (0.5 M), le réactant, une solution de lactose à 5 g l^{-1} (sans dialyseur). Les tensions d'entrée sur l'enregistreur sont à chaque fois indiquées en mV (sensibilité). Inversément, l'élévation de la température exerce une influence défavorable sur la stabilité de l'écoulement du flux (pulsations) même si la spirale est en verre (le phenomène est encore plus marqué si la spirale est en téflon). La viscosité qui décroît lorsque T augmente, présente un moins bon coefficient d'amortissement aux à-coups de la pompe, auxquels s'ajoutent ceux dus au dégazage brutal du flux.

TABLEAU I

HAUTEUR DU PIC À L'ÉQUILIBRE (≙ PLATEAU) EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE DE LA SPIRALE DE RÉACTION

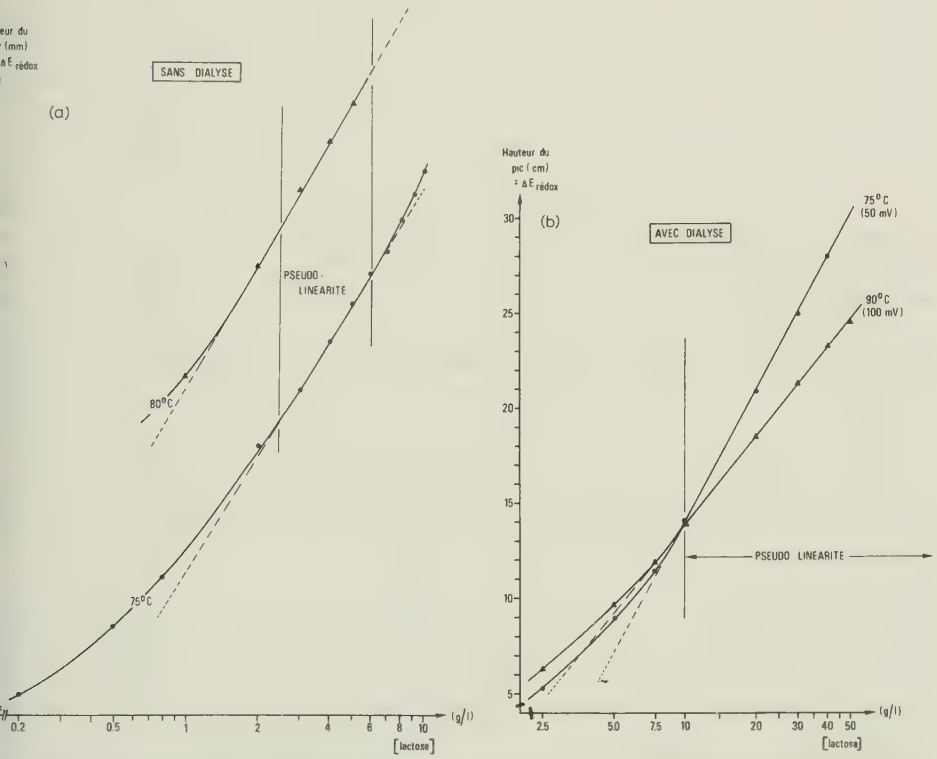
Température (°C)	*Hauteur pic (cm)*	*Sensibilité (mV)*	*Température (°C)*	*Hauteur pic (cm)*	*Sensibilité (mV)*
45	11,8	50	70	20,9	100
50	16,5	50	75	11,9	200
55	22,1	50	80	13,8	200
60	14,2	100	85	15,7	200
65	17,1	100	90	18,0	200

L'expérience montre que le domaine de travail optimum se situe entre 70°C et 85°C. La température de 75°C a été retenue pour la plupart des essais, dont certains ont été répétés à des températures plus élevées ($\leqslant$ 90°C). [Le dégazage provient d'une part de la diminution de la solubilité de l'air dissous, d'autre part de la formation du CO_2 produit par oxydation du lactose[2]. C'est vraisemblablement la raison pour laquelle la stabilité du signal est nettement meilleure lorsque le réactif a reposé pendant quelques jours ou qu'il a été préchauffé (opération que l'on peut également faire en flux continu)].

ESULTATS ET DISCUSSION

érification de la (pseudo)linéarité

Sans dialyse. L'analyseur a été testé au moyen d'une série de solutions de ctose dont la concentration varie de 0,2 à 5 g l^{-1}. Ce domaine de concentration a é choisi en fonction des rendements que l'on peut atteindre par la dialyse d'un it contenant environ 50 g l^{-1} de lactose. Le réactif est le même que celui mentionné paragraphe précédent; la température de réaction est fixée à 75°C, puis à 80°C. Fig. 4(a) donne la hauteur moyenne des pics obtenus sur l'enregistreur pour des mps d'aspiration de l'échantillon et de rinçage (t_a et t_r) de 30 s chacun (c'est à dire our 60 analyses/h). On remarque que, dans un certain domaine de concentration, hauteur du pic, donc $\Delta E_{\text{rédox}}$, est bien proportionnelle, à une constante additive rès, au logarithme de la concentration en lactose ("pseudo-linéarité"), ce qui est en ccord avec la théorie[1] et avec la vérification manuelle[2]. La forme générale est lle d'une branche d'hyperbole[1].



g. 4. Signal obtenu ($\triangleq \Delta E_{\text{rédox}}$) en fonction de la concentration du lactose engagé, sans dialyse (a) et ec dialyse (b).

Avec dialyse. L'essai est effectué à 75°C et à 90°C dans les mêmes conditions ue précédemment. Cette fois, les solutions de lactose, dont la concentration varie e 2,5 à 50 g l^{-1}, sont dialysées (membrane Technicon type 157-0144) à tem-érature ambiante contre de l'eau contenant 0,1% de détergent (Teepol), qui stabilise

le flux à travers l'appareillage. La Fig. 4(b) montre la hauteur des pics obtenus en fonction de la concentration du lactose engagé, l'enregistreur étant directement relié aux 2 électrodes. On constate qu'en dessous de 30 g l^{-1} pour 75°C—respectivement de 20 g l^{-1} pour 90°C—les valeurs s'écartent notablement de la droite de régression, ce qui est en accord avec la théorie; le "seuil inférieur de linéarité"[2] n'est pas atteint: la concentration du lactose dans le dialysat est trop faible, le rendement de la dialyse étant de 2,5% seulement. En d'autres termes, on peut dire que la dialyse équivaut à une dilution de 1:40.

Reproductibilité

Sans dialyse. La reproductibilité des mesures électrochimiques classiques en flux continu, en particulier des mesures de potentiel rédox, dépend étroitement de la régularité du flux, en raison notamment des divers potentiels électrocinétiques engendrés. C'est probablement l'un des principaux inconvénients de telles méthodes comparativement aux méthodes colorimétriques.

Un essai de reproductibilité à été effectué en répétant 62 fois consécutives le même dosage dans les conditions suivantes: [Ce(IV)] = 20 mM; [lactose] = 5 g l^{-1}; T = 90°C; $t_a = t_r = 30$ s ($\triangleq$ 60 analyses/h); la spirale de réaction (encore en téflon) a 12 m de longueur et 1,8 mm de diamètre intérieur. Bien que de telles conditions soient assez sévères, on obtient encore une déviation standard $s = 0{,}370$ pour une hauteur moyenne de pics de 90,61 unités d'enregistreur (utilisé sur 200 mV), c'est à dire $s_r = 0{,}0040$. Le plateau correspondant à une aspiration continue est régulier.

Avec dialyse. Le même essai a été répété en dialysant un lait entier au lieu d'introduire directement du lactose dilué dans le conduit (C) (*cf.* Fig. 2). Vu l'élargissement des pics enregistrés par suite d'une contamination entre échantillons au niveau du dialyseur, $t_a = 1{,}5$ min et $t_r = 2{,}5$ min ($\triangleq$ 15 analyses/h). L'essai donne $s = 0{,}739$ pour une hauteur moyenne de pics de 93,10 unités d'enregistreur (réglé cette fois sur 100 mV), ce qui correspond à $s_r = 0{,}0079$ (l'essai porte sur 33 déterminations consécutives). La reproductibilité est donc satisfaisante si l'on veille à stabiliser l'écoulement du flux (*cf.* les remarques correspondantes faites à propos de la réalisation de l'analyseur). On ne constate pas de dérive systématique de la ligne de base ou de la hauteur des pics, ce qui signifie que la résistance chimique et mécanique des tuyaux de pompe est suffisante, même vis-à-vis du réactif.

Sensibilité

Dans le domaine où la hauteur h du pic est proportionnelle, à une constante additive près, au logarithme de la concentration c du lactose, la sensibilité absolue de la méthode croît lorsque la pente dh/dc croît, c'est à dire lorsque c diminue. La sensibilité relative, qui est le critère le plus important pour une méthode d'analyse recourant à des solutions étalons, tient compte non seulement de la pente dh/dc mais également de la valeur absolue de h. On peut la définir par la nouvelle fonction

$$H_c = (dh_c/dc) \cdot h_c$$

fonction dont la dérivée première par rapport à c est une constante, donc indépendante de c. On en déduit que la sensibilité relative de la méthode, pour une température et un temps de réaction donnés, est toujours la même, quels que soient la concentration de l'échantillon et/ou le rendement de la dialyse. La méthode

roposée est donc particulièrement avantageuse si le composé à doser se trouve en ible quantité, puisque la limite de détection s'en trouve ainsi abaissé.

Un essai consistant à faire varier chaque fois de 1% la concentration en lactose une solution donnée (100% relatifs égalent ici 1,25 g l^{-1}*) a donné les résultats ue présente le Tableau II. La sensibilité obtenue permet donc une mesure exacte ± 1% relatif.

ABLEAU II

ENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

oncentration du lactose		*h(mm) à 85°C*[a] *(sur 100 mV)*	*h(mm) à 75°C*[a] *(sur 50 mV)*
elative (%)	*Absolue (g l^{-1})*		
96	1,200	175	224
97	1,213	176	225
98	1,225	177	226
99	1,238	178	228
00	1,250	178	228

Hauteur *h* du plateau enregistré (sur 50 mV ou 100 mV), à ±0,5 mm près.

pécificité

La méthode proposée n'est pas, en elle-même, spécifique au dosage d'un mposé donné (au lactose par exemple) à l'exclusion de tout autre. Aussi tous les ssais, à une exception près, ont-ils été effectués jusqu'ici avec des solutions ne ontenant que du lactose (en montant parfois un dialyseur pour simuler une applica- on au lait). Il était en effet préférable de développer et de mettre au point ce ouveau type d'analyseur en flux continu dans les conditions idéales qu'offre le osage d'une substance pure.

Il est clair que, dans la pratique, de telles conditions de travail ne se rencon- ent que rarement. Dans la plupart des cas, la matrice est complexe et interfère vec la réaction rédox désirée. Lors de l'étude de l'application manuelle de cette néthode au dosage cérimétrique du lactose du lait, il s'est avéré que les protéines actiques donnent une très importante réaction rédox avec le cerium(IV). Il avait lors été proposé d'éliminer ces dernières par l'une des techniques classiques aux- uelles on recourt en pareil cas: la dialyse ou la précipitation. Les essais de spécificité ont très simples: on fait passer successivement un échantillon de lait (contenant 0 g l^{-1} de lactose) et une solution ne contenant que du lactose (à 50 g l^{-1} galement). Si la séparation (par dialyse ou par précipitation) est quantitative, n doit retrouver le même signal.

L'expérience montre malheureusement qu'il n'en va pas ainsi:

(a) Avec une dialyse (contre l'eau), on obtient des pics à l'équilibre de 230 m de hauteur pour le lait, contre 176 mm seulement pour la solution ne contenant

* On tient compte du rendement de la dialyse qui est environ 2,5% (*cf. Vérification de la (pseudo)- néarité–Avec dialyse).*

que du lactose (la température de réaction est de 75 C; l'enregistreur est utilisé sur 50 mV; les autres conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment).

(b) Avec une précipitation par l'acide trichloracétique, on obtient des pics (équilibre également atteint) de 210 mm de hauteur pour le lait, contre 160 mm pour la solution équivalente de lactose (les conditions expérimentales sont les mêmes que pour (a), sauf pour l'enregistreur utilisé sur 200 mV, les solutions de lactose étant plus concentrées).

À concentration égale en lactose, on remarque donc que le signal obtenu avec le lait est nettement plus grand que celui obtenu avec la solution de lactose, quel que soit le mode d'élimination des protéines utilisé (a ou b). On en déduit que ces deux techniques ne peuvent hélas éliminer quantitativement les autres composants du lait qui réagissent aussi avec le cerium(IV). L'essai (b) a été répété à deux autres températures pour la réaction rédox, l'une inférieure (45 C) et l'autre supérieure (90 C), les solutions (lait et lactose pur) étant testées à deux concentrations différentes (45 et 50 g l^{-1}). Les résultats sont consignés dans le Tableau III. Cette dernière expérience confirme la conclusion précédente. On remarque en effet que la difference relative des signaux obtenus avec le lait et avec la solution de lactose décroît lorsque la température augmente. La raison en est vraisemblablement la suivante: le coefficient Ψ_1 (nombre d'équivalents de réducteur que fournissent pendant la réaction les substances rédox autres que le lactose) augmente moins que le coefficient Ψ_2 (nombre d'équivalents de réducteur que fournit le lactose pendant la réaction rédox) avec la température. C'est donc bien une preuve de la présence dans le lait (après déprotéinisation) de substances réductrices autres que le lactose, plus réactives même que ce dernier vis à vis du cerium(IV). C'est probablement la raison pour laquelle on ne trouve semble-t-il pas d'exemple dans la littérature de dosage cérimétrique des glucides dans des milieux biologiques; on recourt pratiquement toujours au $K_3[Fe(CN)_6]$ qui est un oxydant beaucoup plus faible ($E_0 = 1{,}44$ V à 25 C pour le couple Ce(IV) Ce(III), contre $E_0 = 0{,}46$ V à 25 C et à pH = 12 pour le couple $[Fe(CN)_6]^{3-}$ $[Fe(CN)_6]^{4-}$) donc moins sensible, mais plus sélective.

TABLEAU III

SPÉCIFICITÉ APRÈS TRAITEMENT À L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

Température réaction rédox (°C)	*Hauteur du pic (plateau) enregistrés (en mm)*[a]			
	Sol. lactose (45 g l^{-1})	*Sol. lactose (50 g l^{-1})*	*Lait (45 g l^{-1})*	*Lait (50 g l^{-1})*
45	53±1	61±1	232±1	249±1
75	308±2	320±2	390±2	420±2
90	550±5	610±5	690±5	770±5

[a] Les hauteurs indiquées pour les pics à 75° et 90°C ont été rapportées à 100 mV/250 mm.

Une étude de la concordance de cette méthode avec une méthode de référence (coefficient de corrélation) ne se justifie donc pas dans le cas d'une application au lait.

onclusion

Le modèle théorique[1], déjà vérifié manuellement en discontinu[2], est également érifié en flux continu. L'analyseur automatique proposé dans ce travail est utilisable n principe pour n'importe quel couple rédox (réversible ou non). Si le cerium(IV) st un oxydant insuffisamment sélectif pour doser le lactose dans le lait, à cause es réactions que produisent les autres composants de la matrice, le dosage rédox udié est néanmoins intéressant en tant qu'exemple. Puisque la méthode générale roposée permet de travailler entre n'importe quelles étapes *i* et *j* de la réaction rédox, n pourrait éventuellement faire subir au lait un prétraitement (différentiel) pour xyder au maximum les composants indésirables du lait tout en ménageant le actose, mais un tel dosage perdrait alors beaucoup de son intérêt pour la pratique l faudrait encore faire disparaître ce réactif intermédiaire). Mieux vaut recourir un changement d'oxydant (par exemple $K_3[Fe(III)(CN)_6]$). L'application possible e cette même méthode pour le dosage des solides totaux non gras du lait entier[2] 'a pas encore été testée.

ÉSUMÉ

La première partie du présent travail a pour objet le développement d'un nalyseur automatique conçu pour des mesures de systèmes rédox par potentiométrie différentielle en flux continu. Sur la base d'un diagramme des flux, diverses ariantes sont étudiées pour la réalisation pratique de cet analyseur, en ce qui oncerne notamment le choix des matériaux, la disposition des composants, la hermostatisation du "manifold", la géométrie des électrodes et du pont électrolytique. La seconde partie du travail est consacrée aux résultats obtenus lors de l'utilisation le cet analyseur pour le dosage cérimétrique d'un glucide (le lactose) dans des olutions pures d'abord, puis le lait (matrice complexe). Les essais effectués visent déterminer l'influence des conditions expérimentales (température et temps de éaction), à vérifier la (pseudo)linéarité, puis la reproductibilité, la sensibilité et la pécificité de la méthode. Les résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus nanuellement en discontinu (*cf.* Partie II), ce qui vérifie donc à nouveau le modèle héorique général proposé (*cf.* Partie I). On constate néanmoins que le Ce(IV) est n oxydant trop puissant pour un dosage dans le lait. Si cet oxydant est intéressant arce qu'il augmente considérablement la sensibilité de la méthode (le $\Delta E_{\text{rédox}}$ associé st d'autant plus grand que la réaction rédox est importante), il est par contre nsuffisamment spécifique: ni la dialyse, ni la précipitation dans l'acide trichloracéique ne parviennent à éliminer quantitativement toutes les substances qui peuvent éagir avec le Ce(IV), même à froid. L'emploi d'un oxydant plus ménageant doit tre envisagé, tel le $K_3[Fe(III)(CN)_6]$ par exemple.

UMMARY

The development of an automatic analyzer for the measurement of redox ystems by differential potentiometry in continuous flow is described. Variations in everal instrumental parameters were studied. The analyzer was applied to the determination of a carbohydrate (lactose) with cerium(IV) solution, first in distilled vater and then in milk. The results obtained in examining the influence of different

experimental conditions, and the linearity, sensitivity and the specificity of the method, confirmed the previous results obtained manually. However, cerium(IV) proved to be too strong an oxidant for the measurement of lactose in milk. Cerium(IV) increased the sensitivity of the method, but was insufficiently selective; neither dialysis nor precipitation with trichloracetic acid eliminated quantitatively all interferences, even at low temperatures. Milder oxidants are necessary.

RÉFÉRENCES

1 J. O. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 67 (1973) 403.
2 J. O. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 68 (1973) 161.
3 D. G. Porter and R. Sawyer, *Analyst (London)*, 97 (1972) 569.
4 G. K. Buckee, *J. Inst. Brew, London*, 78 (1972) 222.
5 J. O. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 75 (1975) 474.
6 P. Van den Winlzel, J. Mertens and D. L. Massart, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1765.

Analytica Chimica Acta, 70 (1974) 327–339

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

NOUVELLE MÉTHODE DE DOSAGE PHOTOMÉTRIQUE AUTOMATIQUE DES PROTÉINES DANS LE LAIT ENTIER

PARTIE I. BASES THÉORIQUES ET OPTIMISATION DES PRINCIPAUX PARAMÈTRES DE LA RÉACTION

J. BOSSET et B. BLANC

Station fédérale de recherches laitières, 3097 Liebefeld-Bern (Suisse)

E. PLATTNER

Institut de génie chimique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1025-Lausanne (Suisse)

(Reçu le 15 novembre 1973)

D'une étude récente et bien documentée[1] tendant à faire le point des méthodes les plus couramment utilisées pour déterminer la teneur en protéines du lait entier frais, il s'avère que l'une des méthodes les plus avantageuses, celle dite "du biuret", n'a pas trouvé en chimie laitière le développement et l'emploi généralisé qu'elle a rencontré dans un domaine voisin, la chimie clinique[2]. Malgré sa grande simplicité (méthode colorimétrique directe ne nécessitant dans son principe ni séparation préalable — *cf.* méthodes au dye-binding — telle que dialyse, filtration ou centrifugation, ni minéralisation), sa sensibilité (quelques μl suffisent), sa relativement bonne spécificité (la réaction fait intervenir les ponts peptidiques, éléments constitutifs par excellence des chaînes protéiniques), son excellente reproductibilité, sa stabilité (quelques $^0/_{00}$ de dérive/h), cette méthode analytique a été jusqu'ici presque complètement délaissée au profit d'autres méthodes[1] bien plus compliquées et laborieuses. Cette situation a vraisemblablement pour origine les deux causes principales suivantes:

la méthode du biuret n'est pas utilisable, sous sa forme habituelle, pour le dosage des protéines du lait entier à cause de l'extrême turbidité de ce milieu.

le lactose interfère par son caractère réducteur et par le complexe bleu qu'il forme avec le cuivre(II) engagé comme réactif.

La littérature ne fait mention que de quelques essais d'utilisation de la réaction du biuret pour le dosage de protéines lactiques[3–7], mais il ne s'agit pourtant que de travaux isolés qui n'ont jamais donné lieu à des applications pratiques sur une grande échelle.

Le présent travail propose une solution simple, rapide et efficace permettant de parer à ces deux inconvénients majeurs par l'emploi d'un solvant puissant capable de dissoudre intégralement et simultanément les caséines et la matière grasse (le lait devenant ainsi une solution vraie), et l'emploi d'un chélateur assez puissant pour stabiliser (vis-à-vis du lactose) l'excès de cuivre(II) à engager, sans entraver pour autant la réaction colorimétrique avec les protéines. Pour obtenir une valeur plus exacte, il est encore possible de corriger par le calcul les erreurs dues aux variations de la teneur en lactose, si ce dernier fait parallèle-

ment l'objet d'un dosage par une autre méthode.

C'est dans ce but qu'a été développé, au cours d'une étude antérieure, le mélange dissolvant: soude (2 volumes; 0,1 à 0,2 *M*) + n-butylamine (3 volumes; pure), capable de dissoudre quasi instantanément le colloïde qu'est le lait entier. Parallèlement, cette amine complexe l'excès de cuivre(II) engagé, affaiblissant le complexe Cu(II)–ose, sans empêcher le complexe du biuret de se former (Cu(II)–protéines). Quant à l'action réductrice du lactose sur le cuivre(II), on peut l'inhiber ou la rendre négligeable en jouant sur les diverses cinétiques des réactions en compétition (influence surtout de la température).

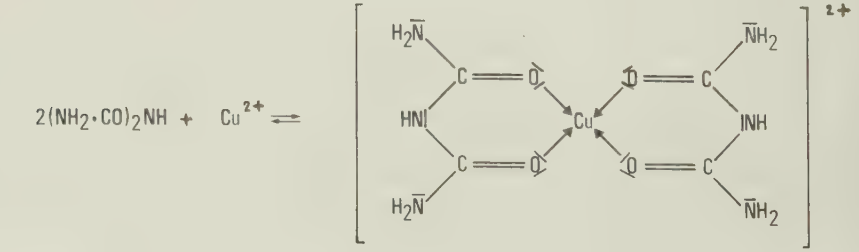
THÉORIE ET PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode est basée sur la propriété du cuivre(II) de former de manière reproductible un complexe coloré et stable avec les ponts peptidiques des protéines[8]. Il faut au moins un tripeptide (2 ponts –CO NH–) pour que la réaction puisse se produire. Le composé le plus simple qui soit capable de donner une réaction positive est le biuret produit de condensation à chaud de l'urée. La réaction est spécifique aux (poly)peptides et aux protéines. Les autres composés azotés du lait, tels que l'ion ammonium, les acides aminés libres en général, *etc.*, sont en concentrations suffisamment faibles pour qu'ils n'interfèrent pas ou de manière constante. Il faut néanmoins rappeler que cette réaction a lieu avec toutes les substances contenant deux groupes $-CONH_2$ liés soit directement, soit par l'intermédiaire d'un autre atome. Il en est de même[9] pour les composés contenant les groupes $-CH_2NH_2$, $-CH(NH)NH_2$, $-CSNH_2$, *etc.* au lieu de $-CONH_2$.

La coloration violette observée en milieu très alcalin est très probablement due à la formation d'un complexe de coordination des ions cuivriques avec les doublets électroniques libres des atomes d'azote et même d'oxygène dans certains cas. Suivant le pH du milieu et le rapport N (peptidiques) Cu(II), on connaît actuellement trois types de complexes différents (solides cristallisés):

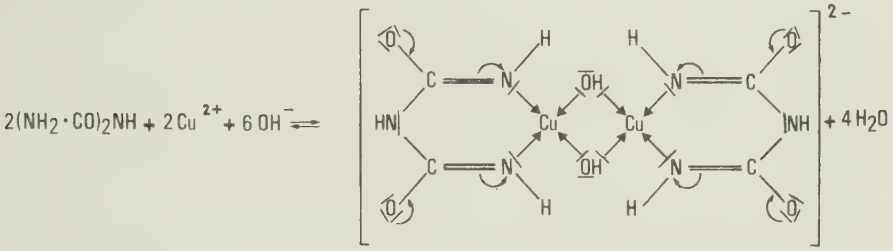
(a) le chlorure de bis (biuret) cuivrique, vert pâle, $[Cu(C_2H_5N_3O_2)_2]Cl_2$ obtenu à partir d'une solution dont les concentrations molaires en biuret, en cuivre(II) et en soude sont dans le rapport 2:1:0 (abrégé BT: Cu: OH = 2:1:0). Dans ce type de complexe, à caractère de cation bivalent, le cuivre(II) est lié par coordination aux oxygènes des 4 fonctions amides provenant de 2 molécules de biuret, chacune d'elles fonctionnant comme un ligand neutre. Les 4 oxygènes se situent aux sommets d'un carré légèrement distordu (configuration non rigoureusement coplanaire), admettant le cuivre(II) comme centre[10–12]:

BT : Cu : OH = 2 : 1 : 0



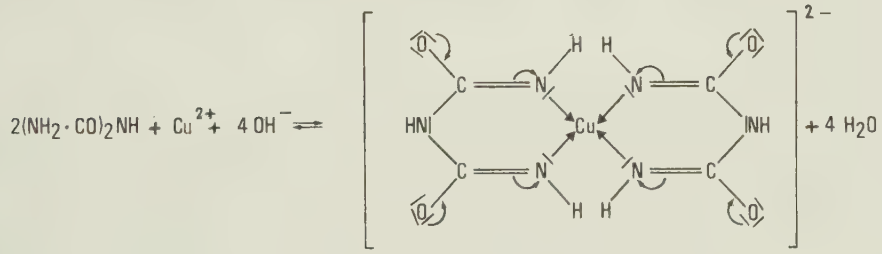
(b) le di-μ-hydroxyle-bis(biureto)dicuprate(II) de potassium tétrahydraté, $K_2[Cu(C_2H_3N_3O_2)(OH)]_2 \cdot 4\ H_2O$, violet, obtenu à partir d'une solution où BT:Cu:OH $\simeq$ 2:2:6, semble ne contenir qu'un reste biuret par atome de cuivre; ce complexe se comporterait dans son ensemble comme un anion bivalent et aurait une structure de dimère avec 2 groupes hydroxyles servant de ponts entre les 2 Cu(II); en outre, les 2 molécules de biuret sont coordinées à 2 atomes de Cu(II) par l'intermédiaire des azotes de leurs fonctions amides[10,13–15]:

BT : Cu : OH = 2 : 2 : 6



(c) le bis(biureto)cuprate(II) de potassium tétrahydraté, $K_2[Cu(C_2H_3N_3O_2)_2] \cdot 4\ H_2O$, rouge, obtenu à partir d'une solution où BT:Cu:OH $\simeq$ 2:1:4, se comporte aussi dans son ensemble comme un anion bivalent. Dans ce nouveau complexe, le cuivre(II) serait cette fois-ci coordiné dans une configuration de plan carré directement par les azotes des 4 fonctions amides de 2 molécules de biuret, fonctionnant chacune à nouveau comme un ligand dianionique en suite de l'ionisation de leurs hydrogènes[10–15]:

BT : Cu : OH = 2 : 1 : 4



On trouve encore quelques informations intéressantes[10] concernant la position des maxima (λ_{max}) obtenus par spectroscopie de réflexion dans l'u.v. et le visible, soit: à 279 nm (35,800 cm^{-1}) et à 541 nm (18,500 cm^{-1}) pour le complexe b; à nouveau à 279 nm (35,800 cm^{-1}), et à 495 nm (20,200 cm^{-1}) pour c.

Les couleurs indiquées pour les trois types de complexes considérés (a, b et c) peuvent être interprétées selon la théorie spectrochimique qui indique une augmentation du champ ligand[16] pour les coordinations suivantes: $[CuO_4] < [CuO_2N_2] < [CuN_4]$.

Les quelques indications qui précèdent sont valables pour les complexes

à l'état solide. En milieu aqueux, on assiste à un déplacement hypsochrome de 495 à 505 nm[13,14,17] pour le complexe c et de 541 à 560–570 nm[13,14] pour le complexe b.

Ce qui a été vu précédemment pour les complexes cuivre(II)–biuret doit encore être vrai pour les complexes cuivre(II)–protéines en tant que polypeptides. Il faut néanmoins noter une différence entre ces deux classes de complexes: dans les premiers, le cuivre(II) est lié aux atomes d'azote des amides dans une structure cyclique hexagonale; dans les seconds, on ne peut qu'envisager une structure cyclique pentagonale, les atomes d'azote considérés n'étant séparés que par deux atomes dans les protéines au lieu de trois dans le biuret[14].

Dans la méthode proposée, il se forme compétitivement au moins un autre complexe coloré, celui que forme la n-butylamine, engagée comme dissolvant des protéines et des lipides du lait, avec l'excès de cuivre(II). La n-butylamine forme, comme toutes les autres amines, des complexes colorés avec le cuivre(II). Avec l'ammoniaque en milieu aqueux, on connaît la série des complexes analogues suivants: $[Cu(NH_3)_x(H_2O)_{6-x}]^{2+}$, où x peut varier[18] entre 0 et 5 suivant la teneur en NH_3. Il va donc s'établir un équilibre entre le(s) complexe(s) cuivre(II)–protéines et le(s) complexe(s) cuivre(II)–n-butylamine. Malgré cette seconde réaction colorée (parasite puisqu'elle diminue dans une certaine mesure la sensibilité de la méthode), la réaction du biuret, même réalisée dans de telles conditions, reste encore valable pour le dosage des protéines, puisque: le spectre d'absorption du complexe violet cuivre(II)–protéines, dans le visible et dans le proche u.v., est suffisamment décalé par rapport à celui du complexe bleu cuivre(II)–n-butylamine (vraisemblablement $[Cu(BTA)_4(H_2O)_2]^{2+}$) (*cf.* Fig. 1); et l'équilibre existant entre le(s) complexe(s) cuivre(II)–n-butylamine et cuivre(II) protéines est très déplacé en faveur de ces dernières (*cf.* ci-dessous, *Influence de la concentration en cuivre(II)*).

Finalement il se forme un troisième type de complexe, le(s) complexe(s) cuivre(II)–lactose. Ce point sera repris ultérieurement et traité de façon indépendante.

ÉTUDE DE LA RÉACTION DE COLORATION

Le réactif du biuret comporte: (1) un sel de cuivre(II). On prend généralement le $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$. Il semble que le $Cu(EDTA)Na_2 \cdot \sim 2\ H_2O$, qui présente une sensibilité bien moindre à l'hydrolyse alcaline, assure parallèlement une meilleure reproductibilité (cette constatation a été faite avec une méthode très semblable, celle de Folin-Ciocalteu[19]). Lors de l'étude de la dissolution du lait, il s'est avéré que la fonction EDTA favorisait également la dissolution des caséinates de métaux alcalinoterreux. C'est donc sous cette forme qu'a été engagé le cuivre(II) dans cette étude; (2) un complexant empêchant la précipitation du cuivre(II) sous forme d'hydroxyde. On utilise ordinairement le tartrate double de sodium et de potassium. Avec le sel d'EDTA, ce composant n'est plus indispensable; (3) une solution aqueuse très alcaline (NaOH ou KOH).

Le rapport optimal des concentrations en ces trois constituants ne semble pas être connu avec certitude. Il dépend d'abord du complexe recherché (a, b ou c), mais même pour un type donné, on trouve pour chaque auteur des concentrations différentes.

Il s'ensuit que l'on commencera par rechercher les meilleures conditions de mesure (λ_{max}) en étudiant les spectres d'absorption de ces composés, puis l'influence de chacun des composants du réactif sur le système global, permettant de définir ainsi un rapport optimal de composition. On étudiera encore les conditions de réaction, soit l'influence du temps et de la température de réaction. Cette optimisation des divers paramètres devra respecter les "contraintes" que représentent les conditions optimales définies pour la dissolution du lait, à savoir: 0,1 vol. de lait entier (0,2 vol. à la limite), 2,0 vol. de solution aqueuse de NaOH (0,1 à 0,2 *M*), 3,0 vol. de n-butylamine (éventuellement plus); temps et température de réaction, si possible 1 min à 60°C.

Le mode opératoire consiste à former le complexe violet cuivre(II) protéines en milieu alcalin en ajoutant les réactifs mentionnés à un échantillon de lait entier frais ou correctement conservé. Le cuivre(II) doit être en excès par rapport aux protéines. Suit l'adjonction de n-butylamine pour dissoudre la matière grasse (les caséines étant déjà presque complètement dissoutes). L'expérience a montré qu'il est même possible d'ajouter en une seule fois tous les réactifs préalablement mélangés (y compris la n-butylamine), ce qui simplifie beaucoup le dosage.

Les mesures d'extinction ont été effectuées à l'aide des spectrophotomètres suivants, équipés de cuvettes Hellma OS 110; un Perkin Elmer 124 muni d'un enregistreur PE 165 pour les mesures où le spectre d'absorption est intéressant; ou un Zeiss PMQII pour les mesures à une longueur d'onde donnée (meilleure précision de lecture).

Étude des spectres d'absorption

Les Figures 1(a) et (b) montrent les parties les plus intéressantes des spectres d'absorption, à savoir: E_A, spectre des complexes cuivre(II)–protéines et cuivre(II)–n-butylamine*; E_R, spectre du complexe cuivre(II)$_{total}$–n-butylamine (du réactif); $\Delta E = E_A - E_R$, spectre différentiel (apparent); E_A/E_R, rapport signal/bruit de fond.

Les spectres sont pris après 15 minutes (temps de réaction) à température ambiante. Pour les 100 μl de lait entier (respectivement d'eau pour la référence) engagés, le réactif est composé du mélange suivant: 1,0 ml d'une solution aqueuse de NaOH (0,4 *M*); 1,0 ml d'une solution aqueuse de $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2H_2O$ (19,2 g l^{-1}) et de KNa tartrate $\cdot$ 4 H_2O (12,2 g l^{-1}); et 3,0 ml de n-butylamine (puriss). Les 2 volumes de soude 0,2 *M* indiqués précédemment comme nécessaires pour la dissolution du lait sont remplacés ici par 1 volume de soude de concentration double (0,4 *M*) et 1 volume de solution de cuivre(II) et de tartrate.

Le spectre d'absorption du réactif E_R (avec la n-butylamine), enregistré contre de l'eau, est extrêmement large. Il présente un maximum au voisinage de 705 nm. Ce maximum se déplace vers des longueurs d'onde plus courtes, soit à 685 nm environ lors de l'addition du lait (lactose et surtout protéines). La déformation importante que l'on observe alors dans le "flanc gauche" du nouveau pic d'absorption ainsi obtenu, E_A, toujours enregistré contre de l'eau, révèle sous la forme d'une épaule la formation du complexe dit du biuret.

* Bien qu'on l'omette en première approximation, le complexe Cu(II)–lactose est également une composante de E_A. (A = Analyse; R = Référence).

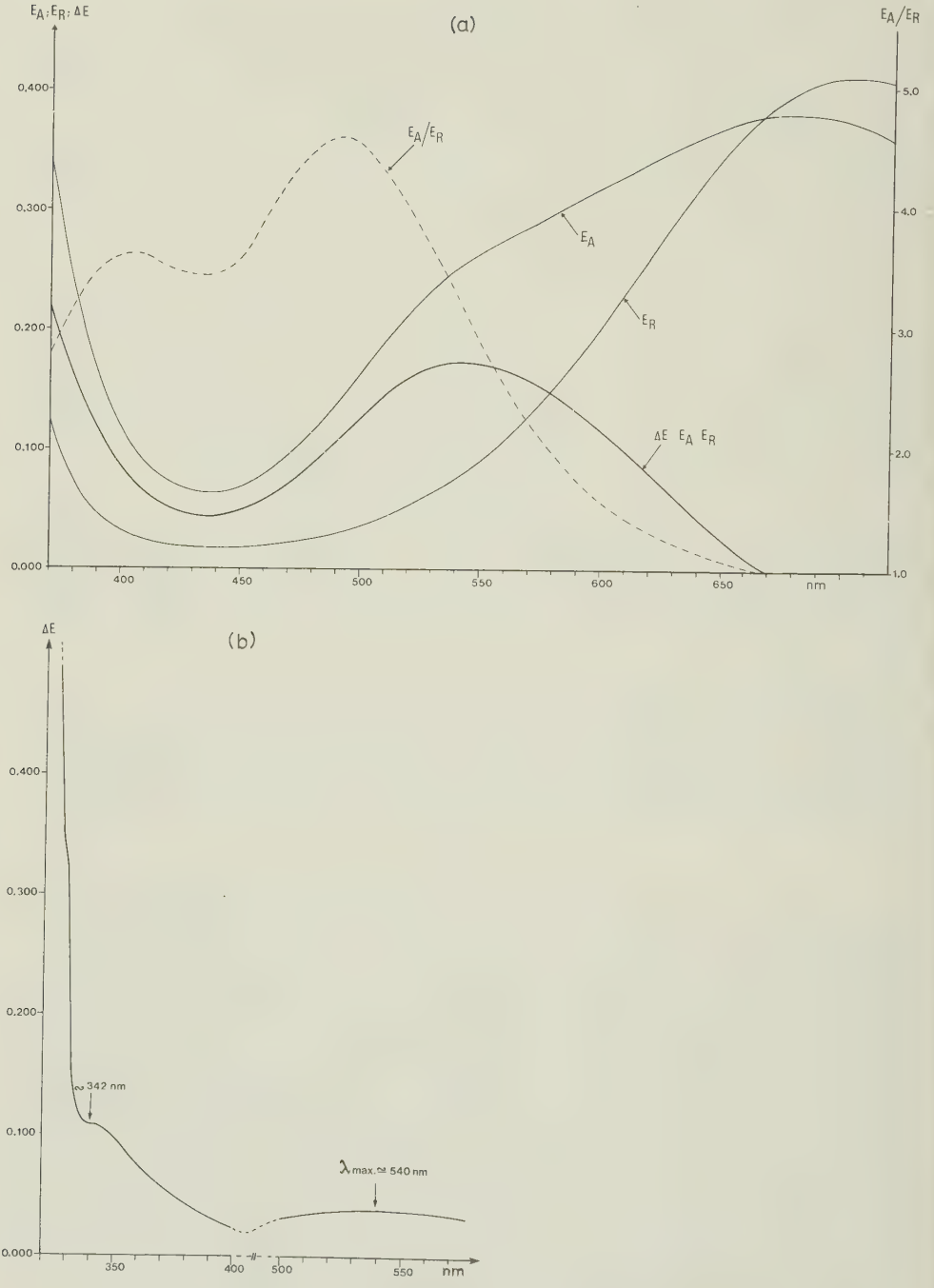


Fig. 1. (a) Spectres dans le visible du complexe dit du biuret E_A et du réactif E_R, de leur différence AE et de leur rapport E_A/E_R. (b) Spectre différentiel ΔE du complexe dit "du biuret" dans le visible et l'u.v.

Le spectre différentiel ΔE (double faisceau) indique un maximum au voisinage de 535–540 nm. Ce maximum ne correspond pourtant pas au rapport optimal E_A/E_R qui se situe au voisinage de 493 nm.

La position de ce maximum d'absorption à 540 nm, valeur intermédiaire entre $\lambda_{max} \simeq 505$ -515 nm (complexe c) et $\lambda_{max} \simeq 560$–570 nm (complexe b) ne permet pas de se décider catégoriquement pour l'un ou l'autre type de complexe. Le type c est néanmoins le plus vraisemblable; il existe certainement un équilibre entre les formes b et c.

Dans l'u.v. proche, le complexe du biuret présente également un pic d'absorption, beaucoup plus intense que dans le visible. Dans les conditions expérimentales choisies, il serait possible de travailler à $\simeq 340$ nm (λ_{max} se situe encore en-dessous de cette valeur), où l'on dispose encore d'une énergie transmise suffisante pour effectuer de bonnes mesures, comme le montre la figure complémentaire 1(b).

Influence de la concentration en soude

Les équations chimiques régissant la formation des complexes a, b et c indiquent théoriquement déjà que la concentration en ions hydroxyles joue un rôle primordial. Il est avantageux de travailler en milieu très alcalin puisque

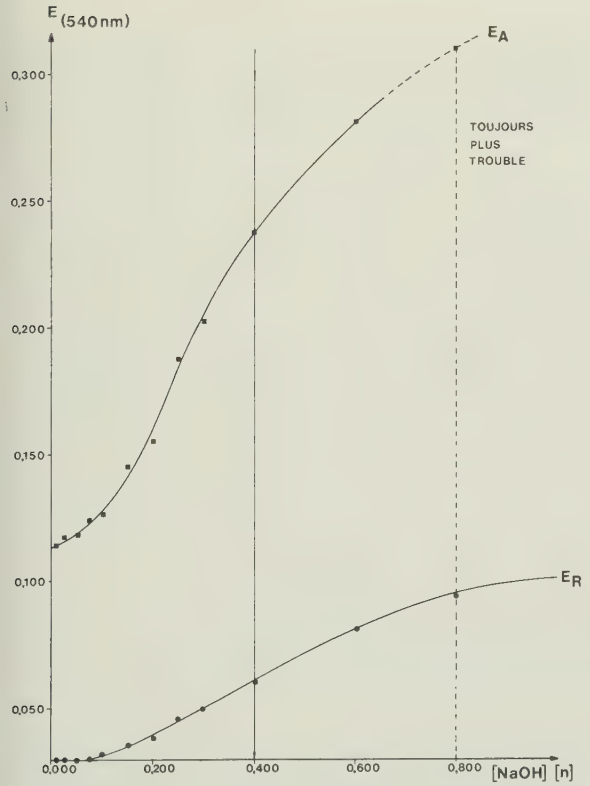


Fig. 2. Influence de la concentration en NaOH sur E_A et E_R (1 ml engagé).

les équilibres sont déplacés en faveur des complexes colorés b ou c, à la condition de rester dans certaines limites. La Figure 2 montre l'influence de la concentration de la soude engagée sur la coloration de l'échantillon E_A et de la référence E_R. Pour cet essai, la composition du mélange (lait ou eau, réactifs) est la même que précédemment, à la concentration de la soude près, qui varie cette fois de 0,000 à 1,000 *M*. Les mesures sont effectuées à 540 nm, contre de l'eau, au moyen du PMQII, après 30 min à température ambiante.

A concentrations égales en protéines et en cuivre(II), la concentration en soude augmente la coloration obtenue pour l'échantillon E_A et pour la référence E_R. Les faibles pentes des graphes de E_A et E_R à l'origine peuvent s'expliquer ainsi: en présence d'un gros excès de n-butylamine, les faibles concentrations en soude n'ont que peu d'effets sur le pH, donc sur la coloration. Au-delà du domaine de concentration optimal (0,4 à 0,6 *M* environ pour 1 ml engagé)*, on retrouve le phénomène de précipitation des protéines (déjà observé lors de l'étude de la dissolution du lait), entraînant une augmentation de la turbidité du milieu, puis la démixtion du mélange dissolvant (eau/soude/n-butylamine).

Une étude parallèle des spectres enregistrés avec le PE124 indique que dans le domaine envisagé la position des sommets des pics n'est pas fonction de la concentration de la soude engagée. On retrouve l'optimum entre 535 et 540 nm (pic à sommet relativement aplati).

Influence de la concentration en cuivre(II)

Tout comme la concentration en soude, la concentration en cuivre(II) favorise la réaction (équilibre, cinétique, *etc.*). C'est ce que montre la Fig. 3. Le mélange réactionnel est le même que précédemment, à ceci près que la concentration en $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2H_2O$ varie cette fois de 0,00 à 19,2 g l^{-1} (1 ml engagé). On fera abstraction du lactose dont l'influence sera étudiée plus loin.) La lecture des extinctions des échantillons et des références est effectuée à 535 nm contre de l'eau au moyen du PMQII, après 15 min de développement de la couleur à température ambiante.

Le graphe obtenu présente une partie médiane à forte courbure (approximativement entre 1,92 et 11,52 g de $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2\ H_2O$ par litre) et deux branches "asymptotiques", l'une à forte pente (Cu en défaut), l'autre à pente faible (Cu en excès). Leur point d'intersection est le point d'équivalence cuivre(II)–protéines comme pour une titration.

La partie médiane de la courbe disparaît lorsque l'essai est réalisé sans n-butylamine (on prend alors du lait écrémé). Il ne subsiste alors que les parties latérales rectilignes, les asymptotes, qui forment un point anguleux au point d'équivalence.

Un tel comportement est significatif de la compétition de deux équilibres:

(a) Cu(II) + protéines $\rightleftharpoons$ Cu(II)–protéines (complexe I)

(b) Cu(II) + n-butylamine $\rightleftharpoons$ Cu(II)–n-butylamine (complexe II)

---

* Pour la réaction de coloration proprement dite, on pourrait engager des concentrations en soude beaucoup plus élevées, comme c'est le cas dans les méthodes proposées en chimie clinique ne nécessitant aucun dissolvant des lipides.

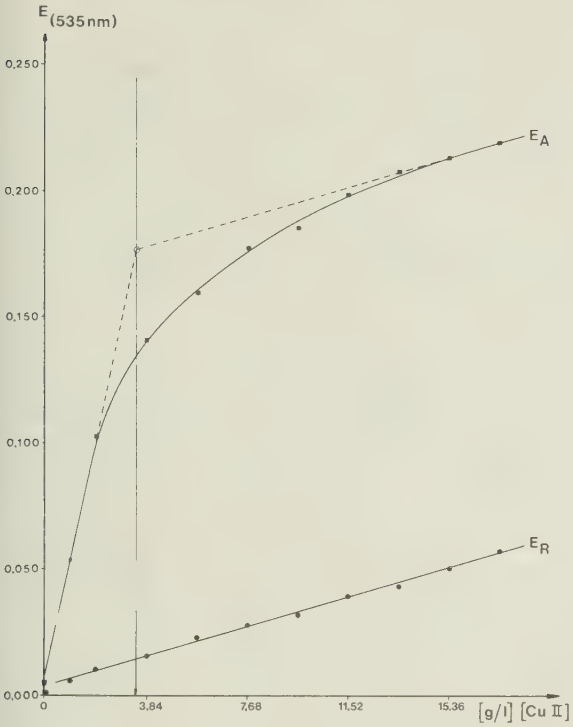


Fig. 3. Influence de la concentration en cuivre(II) sur E_A et E_R (1 ml engagé).

Le complexe I étant plus stable que le II, les protéines complexent presque complètement les premières portions de cuivre(II) ajoutées. Puis progressivement, pour des teneurs croissantes en cuivre(II), s'établit le double équilibre que dictent les équations (a) et (b). La courbe s'infléchit et quitte la première asymptote. Il faut engager un excès de cuivre(II) relativement important pour retrouver une croissance linéaire, la seconde asymptote. Dans ce cas, on peut considérer que l'équilibre (a) est pratiquement complètement déplacé vers la droite, au profit du complexe I. La concentration de $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2\,H_2O$ utilisée jusqu'ici ($19{,}2\ g\ l^{-1}$) était donc justifiée.

Cette seconde symptote est approximativement parallèle à la droite des E_R (solutions de références), ce qui confirme encore l'interprétation donnée à la forme du graphe des E_A.

En déterminant l'abscisse du point d'intersection des deux asymptotes, on obtient l'équivalence pour 3,46 g de $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2\,H_2O$ (P.M. = 433,8 par litre); le volume engagé étant 1 ml pour ce réactif, la stoechiométrie est donc réalisée avec *ca.* 8 microatome-g de cuivre(II). En travaillant avec 19,2 g de $Cu(EDTA)Na_2 \cdot 2\,H_2O$ par litre, on dispose donc d'un excès (dans le rapport cuivre(II)–protéines) au moins égal à 5, ce qui est pourtant juste suffisant à cause de la n-butylamine. Dans les conditions de travail choisies, on pourrait admettre encore une concentration 25 à 50% plus élevée. Cet ion donnant un(des) complexe(s) fortement coloré(s) avec l'amine en milieu aqueux, il n'est pourtant

pas souhaitable de l'engager en beaucoup plus gros excès: si $\Delta E = E_A - E_R$ ne peut plus croître, E_A/E_R par contre décroît en tendant vers 1.

Pour calculer le nombre de microatome-g d'azote peptidique engagé dans cet essai, on dispose des données de base suivantes: volume de lait engagé, 0,1 ml; poids spécifique, 1,03 [g ml^{-1}]; teneur en azote total (TN) selon Kjeldahl, 0,52 g % (g d'azote pour 100 g de lait frais); et teneur en azote peptidique (PBN), 89% du TN*. On obtient ainsi *ca.* 34 μat-g d'N peptidique. Pour les conditions expérimentales choisies, on en déduit donc que le rapport N (peptidique)–cuivre(II) vaut en moyenne 4, ce qui est en parfait accord avec la conclusion de Mehl et coll.[20] et confirmerait bien l'hypothèse précédente, à savoir qu'il doit s'agir du complexe type c.

Si l'on effectue le même calcul avec la n-butylamine engagée, dont tous les azotes peuvent être ligands, on obtient *ca.* 30.350 μat-g d'N, soit en gros 10^3 fois plus que précédemment. Quel que soit le type de complexe Cu–n-butylamine envisagé $[Cu(C_4H_9 \cdot NH_2)_x]^{2+}$, où $1 < x < 6$, l'excès de l'amine est énorme pour le cuivre(II) comparativement à l'azote peptidique présent (calcul effectué pour 3 ml de n-butylamine, de densité = 0,740 et de poids moléculaire = 73,14). La formation prioritaire du complexe I dans de telles conditions prouve donc que le pouvoir complexant des peptides est bien supérieur à celui de l'amine. Il n'est néanmoins pas possible de diminuer la concentration de la n-butylamine à engager, cette dernière étant requise pour obtenir une dissolution du lait suffisante: d'où l'importance de la différence des constantes de dissociation des deux complexes, sans laquelle la méthode proposée serait à rejeter.

Influence du temps et de la température de réaction

Dans la méthode du biuret utilisée pour le dosage des protéines sériques[2], il est recommandé d'effectuer la mesure après un temps de réaction de 30 min à température ambiante. Ces deux paramètres ont été étudiés simultanément comme suit: à 0,1 ml de lait, respectivement d'eau pour la référence, on ajoute rapidement les 5 ml du mélange de réactifs décrit précédemment pour l'étude des spectres d'absorption. Immédiatement après le mélange (temps zéro), on verse aussi rapidement que possible la solution à mesurer dans la cuvette du spectrophotomètre PE-124 et l'on enregistre l'évolution de la coloration de l'échantillon en fonction du temps et à différentes températures (20°, 30°, 40° et 50°C). Les mesures, effectuées à 535 nm contre E_R sont présentées par la Fig. 4, en % de la coloration ou de l'extinction finale (= 100%). Cette dernière est atteinte approximativement en 30 min, quelle que soit la température.

La température jusqu'à 40°C ne joue pratiquement aucun rôle dans le développement de la couleur, ce qui prouve que l'énergie d'activation pour la formation de ce complexe est très faible. A partir de 50°C, les mesures deviennent instables et décroissent irrégulièrement, avec une perte de sensibilité, ce qui est en accord avec les résultats de Zak et Cohen[19]. Il faut peut-être attribuer cet effet à la réduction du cuivre(II) en cuivre(I) par le lactose, le milieu étant suffisamment

* Le PBN est déterminé colorimétriquement par la réaction des groupes $-NH_2$ avec la ninhydrine avant et après hydrolyse alcaline; cette valeur de 89% tient compte également du NPN (déterminé par Kjeldahl).

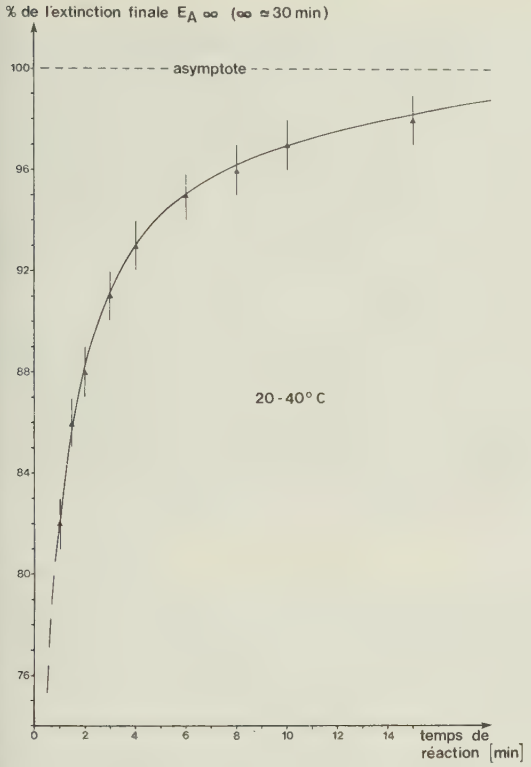


Fig. 4. Étude de la vitesse de réaction (développement de la coloration).

alcalin. De toute façon, ce domaine de température n'est pas à envisager ou ne peut l'être que pour un laps de temps très court vu la forte tension de vapeur du milieu (point d'ébullition de la n-butylamine = 70–78°C) et les risques d'une variation du volume de l'échantillon à mesurer.

Il faut néanmoins rappeler qu'une courte élevation de la température (30 à 60 s à *ca.* 60°C) s'avère des plus bénéfiques pour la dissolution proprement dite des laits très gras ou légèrement altérés par la conservation. Il y a donc un compromis à trouver en fonction du système d'analyse automatique adopté.

Comme le montre la Fig. 4, la coloration croît très rapidement au début de la réaction. Après 2,5 min, on atteint déjà 90% de la coloration finale: après 10 min 97%. Puis il faut attendre encore *ca.* 20 min pour obtenir l'extinction finale. Pour l'analyse manuelle ou dans un système automatique discontinu, où un tel temps d'attente ne pose pas de problème particulier, on peut attendre 30 min (15 min au minimum) avant d'effectuer la mesure. Dans un système à flux continu, on se contentera d'un temps de développement plus court de l'ordre de 5 à 10 min pour éviter l'emploi d'une bobine d'attente exagérément longue (risques de diffusion et de contamination accrus, perte de charge inutile, *etc.*).

CONCLUSION

La présente étude montre qu'il est possible d'adapter au dosage des protéines

du lait entier la méthode du biuret utilisée jusqu'ici avec succès en chimie clinique pour d'autres liquides biologiques (sérum, liqueur cérébro-spinale *etc.*). Si le principe de la méthode reste le même, les conditions expérimentales sont fondamentalement différentes en raison de la nature colloïdale du lait qui doit être dissous. Vu sa très grande simplicité, cette méthode se prête particulièrement bien à une automatisation intégrale, tant en discontinu automatique qu'en flux continu: elle ne nécessite aucune opération de séparation (filtration, centrifugation ou dialyse) ou de digestion. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, on fixera les diverses grandeurs qui définissent la réaction à leurs valeurs maximales admissibles pour la solubilité des divers composants.

La réaction de coloration n'étant que faiblement dépendante de la température, on la laissera se développer à température ambiante pendant 15 à 30 min, ce qui d'une part simplifie la méthode et d'autre part limite la réduction du cuivre(II). Le léger échauffement nécessaire au début de réaction pour faciliter la dissolution du lait peut être obtenu soit par un court préchauffage (en flux continu) soit par la chaleur de réaction du mélange (exothermique) butylamine–soude.

RÉSUMÉ

Le présent travail propose une nouvelle méthode pour le dosage photométrique des protéines dans le lait entier. Après une dissolution rapide et complète des composants responsables de la turbidité du lait (graisses et caséines) par addition de n-butylamine, on fait réagir les ponts peptidiques avec un excès de Cu(II) pour former le complexe dit "du biuret". La simplicité de cette méthode, qui ne nécessite aucune opération de digestion ou de séparation (filtration, centrifugation ou dialyse), la rend idéale pour une automatisation intégrale tant en discontinu qu'en flux continu. Après une étude des structures et des spectres d'absorption des divers complexes possibles avec le Cu(II), les principaux paramètres de la réaction sont optimisés, à savoir la concentration en réactif (soude et $Cu(EDTA)Na_2$), le temps et la température de réaction.

SUMMARY

A new method for the spectrophotometric determination of the protein content of whole milk is proposed. The fat and caseins, which render the milk turbid, are dissolved rapidly and completely by addition of n-butylamine. The peptide bonds are then reacted with an excess of copper(II) in a strong alkaline solution to form the so-called "biuret complex". The simplicity of this method, which requires no separation or digestion, is adequate for full automation either with continuous flow or with discontinuous (automatic) analyzers. After a study of structure and absorption spectra of the different possible copper complexes, the main parameters are investigated, *i.e.* the concentration of the reagents (NaOH and $Cu(EDTA)Na_2$), the time and the temperature of the reaction.

RÉFÉRENCES

1 E. Renner et S. Ömeroglu, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 149 (1972) 267; 149 (1972) 329; 150 (1972) 295; 150 (1972) 338.

2 R. Richterich, *Clinische Chemie (Theorie und Praxis)*, Karger Vrlg., Basel–New York, 1965, pp. 207–209.
3 M. Molnar, *Magy. Kem. Lapja*, 3 (1948) 428.
4 R. Schober, W. Niclaus et W. Christ, *Milchwissenschaft*, 19 (1964) 75.
5 R. Schober, W. Niclaus et W. Christ, *Milchwissenschaft*, 10 (1955) 238.
6 H. Salwin, *Food Res.*, 19 (1954) 235.
7 B. C. Johnson et A. M. Swanson, *J. Dairy Sci.*, 35 (1952) 823.
8 W. Autenrieth et F. Mink, *Münch. Med. Wochenschr.*, 62 (1915) 1417.
9 P. B. Hawk, B. L. Oser et W. H. Summerson, *Practical Physiological Chemistry*, Blakiston, Philadelphia, 14th ed., 1965, p. 180.
10 A. W. McLellan et G. A. Melson, *J. Chem. Soc. A*, (1967) 137.
11 H. C. Freeman et J. E. W. L. Smith, *Acta Crystallogr.*, 20 (1966) 153.
12 H. C. Freeman, J. E. W. L. Smith et J. C. Taylor, *Nature*, 184 (1959) 707; *Acta Crystallogr.*, 14 (1961) 407.
13 K. Aida, Y. Musya et S. Kinumaki, *Inorg. Chem.*, 2 (1963) 1268.
14 M. Kato, Y. Komuro et K. Sone, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 75 (1954) 1134; 76 (1955) 1034; 77 (1956) 308; 78 (1957) 896.
15 M. Kato, *Z. Anorg. Chem.*, 300 (1959) 84; *Z. Phys. Chem. (Frankfurt am Main)* 23 (1960) 375; *Z. Phys. Chem., (Frankfurt am Main)* 23 (1960) 391.
16 P. A. Kober et A. B. Haw, *J. Amer. Chem. Soc.*, 38 (1916) 457.
17 F. A. Cotton et G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry.*, Interscience, New York, 2nd ed., 1968, pp. 905, 906.
18 F. A. Cotton et G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, Interscience, New York, 2nd ed., 1968, p. 680.
19 B. Zak et J. Cohen, *Clin. Chim. Acta*, 6 (1961) 665.
20 J. W. Mehl, E. Pakovska et R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 13.

ytica Chimica Acta, 71 (1974) 97–105
Isevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

UVELLE MÉTHODE DE DOSAGE PHOTOMÉTRIQUE AUTOMA-QUE DES PROTÉINES DANS LE LAIT ENTIER

RTIE II. LINÉARITÉ, SÉLECTIVITÉ, SPÉCIFICITÉ*

OSSET et B. BLANC
ion fédérale de recherches laitières de Liebefeld–Bern (Suisse)
PLATTNER
itut de génie chimique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse)
çu le 2 janvier 1974)

UDE DE LA LINÉARITÉ

Il est reconnu depuis longtemps que la réaction du biuret sous sa forme ssique suit la loi de Lambert–Beer dans un domaine assez vaste. La présence un second complexant du cuivre(II), la n-butylamine, amène à vérifier la validité cette loi pour les conditions expérimentales proposées[1]. Ce point a été étudié de la anière suivante: on ajoute, comme pour les précédents essais, 5 ml du mélange des actifs (2 ml d'une solution de Cu-EDTA $Na_2 \cdot 2\ H_2O$ à 9,6 g l^{-1} en milieu aOH 0,2 *M* et 3 ml de n-butylamine pure) à 0,1 ml de lait entier dont la ncentration, après une série de dilutions avec de l'eau, varie de 0% (≡référence) 100% (lait tel quel). On fait à nouveau abstraction de l'influence du lactose. Les esures sont effectuées avec le PMQII, à 535 nm, contre de l'eau, après 15 min développement à température ambiante. Les résultats obtenus sont présentés par Tableau I.

Dans les conditions expérimentales ainsi définies, la loi de Lambert–Beer est

BLEAU I

RIFICATION DE LA LOI DE LAMBERT BEER EN PRÉSENCE DE n-BUTYLAMINE

nc. du (%)	E_{535}[a]	ΔE[a] *(apparent)*	*Conc. du lait (%)*	E_{535}[a]	ΔE[a] *(apparent)*
	0,061	0,000	20	0,096	0,035
	0,062	0,001	40	0,134	0,073
	0,065	0,004	60	0,164	0,103
	0,070	0,009	80	0,201	0,140
	0,080	0,019	100	0,233	0,172

[a] compris la composante cuivre(II)–lactose omise en première approximation, qui intervient elle ssi proportionnellement avec la concentration.

* Extrait d'une thèse de doctorat menée sous la conduite des Prof. B. Blanc et E. Plattner.

donc vérifiée, en tous cas jusqu'à 80 ou 90% (v/v de lait dans l'eau). Au delà de cette concentration, la réponse photométrique obtenue s'écarte progressivement de la droite de proportionnalité (*cf.* Partie I[1]). C'est ce que montre le schéma de principe de la figure 1, lorsque le rapport Q (concentration en protéines/concentration en cuivre(II)) tend vers 1. Une augmentation de 25% à 50% de la teneur en cuivre(II) du réactif est donc souhaitable pour atteindre un excès suffisant.

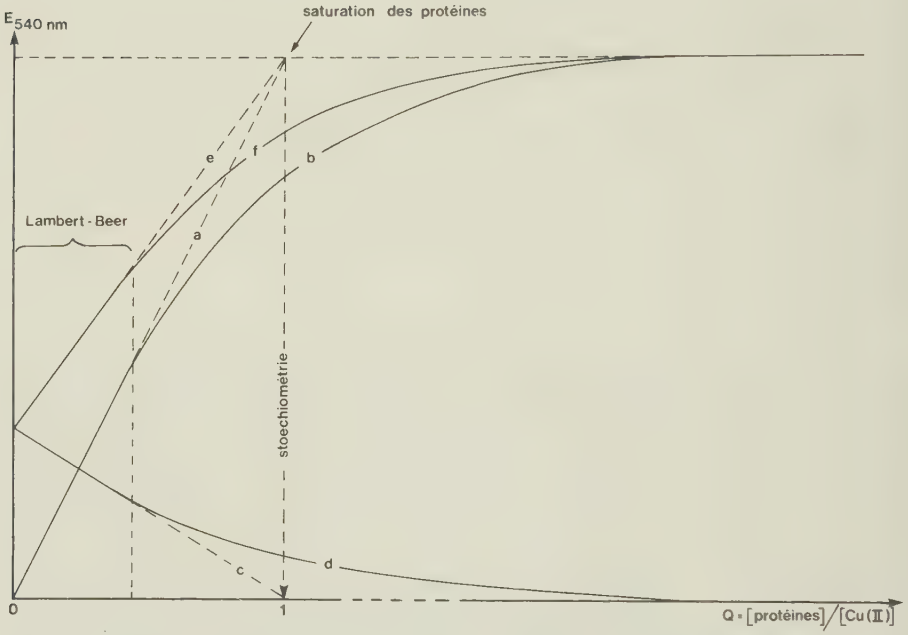


Fig. 1. Variation de la coloration en fonction de la concentration en protéines pour une concentration en cuivre(II) donnée (schéma de principe). a, Réponse (réelle, en négligeant la coloration du cuivre(II) en l'absence de protéine et de BTA) en l'absence de BTA; b, réponse (virtuelle) en présence de BTA (équilibre); c, réponse (virtuelle) de la BTA; d, réponse (virtuelle), différence de f−b (équilibre); e, réponse (virtuelle), somme de a+c; f, réponse (réelle), en présence de BTA (équilibre).

La loi de Lambert–Beer a encore été vérifiée avec d'autres "polypeptides" que les protéines du lait, notamment avec un standard proposé en chimie clinique pour étalonner les dosages de protéines du sérum sanguin (Standard à 5 g/100 ml, Diagnostica de F. Hoffmann–La Roche et Co., AG.).

SPÉCIFICITÉ ET SÉLECTIVITÉ

Si l'on définit la spécificité de la méthode comme la propriété de cette dernière de ne réagir qu'avec les protéines, dans leur ensemble (à l'exception de toute autre classe de substances), on peut définir la sélectivité de la méthode comme sa propriété de réagir différemment avec chaque type de protéine. L'idéal dans le cas présent est de disposer d'une méthode hautement spécifique, mais peu sélective.

De façon générale, on peut dire que la réaction est spécifique aux protéines, ception faite du lactose. Salwin[2] indique que ce dernier est le seul composant non otéique du lactosérum qui contribue à la réaction de coloration. Schober et coll.[3] rviennent à la même conclusion dans leur étude de l'influence des sels anorgaques sur le dosage de la caséine: ces derniers n'interviennent qu'à des conntrations beaucoup plus élevées (fractionnement des protéines[4]). Certains acides inés libres peuvent donner une réaction positive avec le cuivre(II)[5], mais de çon générale, on peut considérer leur effet comme négligeable ou constant dans lait frais et propre.

Quant à sa sélectivité vis à vis de protéines différentes, on trouve dans la térature les avis les plus divergents[4-6]. C'est la raison pour laquelle les coefficients extinction ont fait l'objet de mesures particulières dans les conditions expérimenles propres à ce travail. L'étude a été effectuée avec les principales protéines ctiques*, à savoir avec le l'α- (41%), de la β- (27%) et de la κ- (12%) caséine, olées, purifiées et lyophilisées, avec de la caséine native (mélange des trois, isolé r ultracentrifugation et dialyse) et avec de la caséine selon Hammarsten (mélange gèrement dénaturé, précipité à pH 4.6). Pour les protéines lactosériques, il a été tenu la β-lactoglobuline (9%) et l'α-lactalbumine (3%).

Après une semaine de dessiccation sur P_2O_5 jusqu'à poids constants, on issout ou met en suspension environ 100 mg de protéines (4,5 mg pour l'α-lactalumine vu sa rareté) dans 4 ml de soude 0.4 *M*. Au moyen d'une micropipette ppendorf, 200 µl de solution sont mélangés au 5 ml de réactifs indiqués au paraaphe précédent. Après environ 30 min de reaction à température ambiante, les olutions ainsi obtenues sont mesurées à 540 nm, contre de l'eau. Les résultats btenus sont consignés dans le tableau II. Le même essai, effectué avec 100 µl de

ABLEAU II

ALEURS DES $\varepsilon_{540\,nm}$ OBTENUES POUR LES PRINCIPALES PROTÉINES LACTIQUES[a]

Type	*ΔE (100 µl)*[b]	*Conc. engagée (mg/100 µl)*	ε_{540} *par g de protéine dans 100 µl*[c]	ε_{540} *par mole de protéine dans 100 µl*[c] *(·10³)*	ε_{540} *par pont peptidique*[c] *(·10³)*
-Caséine	0,103	$2{,}584_5$	39,9	941	4,75
-Caséine	0,105	$2{,}384_5$	44,0	1.056	5,08
-Caséine	0,083	$2{,}040_0$	40,7		
Caséine (pH 4.6)	0,100	$2{,}364_5$	42,3	—	—
Caséine (native)	0,106	$2{,}483_5$	42,7	—	—
-Lactoglobuline	0,131	$2{,}341_5$	55,9	1.027	6,38
-Lactalbumine	0,109	$2{,}229_0$	48,9	693	5,68

Toutes les valeurs de ε_{540} indiquées sont entachées d'une erreur de l'ordre de ±3% qui est lue aux erreurs de pesées, de pipetage et de photométrie.

100 µl = Volume de solution ou de suspension de protéine dans NaOH 0,4 *M* engagé pour l'essai.

Apparent, car le E_R mesuré et soustrait (pour obtenir ΔE) est en fait plus grand que le E_R vrai, omme le montre la figure 1.

* Entre paranthèses est indiqué le pourcentage pondéral moyen de chaque type de protéines dans e mélange naturel complet.

solution, donne des valeurs égales à la moitié, ce qui confirme d'une part que l'excès de cuivre(II) engagé est suffisant, d'autre part que la loi de Lambert–Beer est également respectée pour chaque protéine prise individuellement.

L'enregistrement des spectres d'absorption de ces différentes protéines contre le réactif, à savoir ΔE (apparent), indique que leurs λ_{max} se situent tous entre 530 540 nm. Les sommets des pics sont suffisamment plats pour que les petites différences de leurs λ_{max} puissent être négligées.

Si l'on calcule la moyenne pondérée pour le mélange d'α-, β- et κ-caséine (en considérant que leurs poids sont approximativement dans le rapport 3:2:1) on obtient un ε_{540} voisin de 41,4 qui correspond assez bien aux valeurs mesurées de 42,3 pour la caséine selon Hammarsten et de 42,7 pour la caséine native. En conclusion, les différences des ε_{540} par gramme de protéine(s) sèche(s) pour les différentes caséines sont relativement faibles: $-5{,}7\%$ pour l'α-, $-4{,}0\%$ pour la β- et $-3{,}8\%$ pour la κ-caséine par rapport à la valeur obtenue pour le mélange selon Hammarsten. Par contre, la différence est relativement plus importante en ce qui concerne les protéines lactosériques: $+32{,}2\%$ pour la β-lactoglobuline et $+15{,}6\%$ pour l'α-lactalbumine (toujours par rapport à la caséine selon Hammarsten, purifiée considérée comme référence vu son importance quantitative). Si l'on fait la moyenne pondérée totale des valeurs obtenues pour la caséine (*ca.* 42,5 en moyenne) et les protéines du lactosérum, on trouve une valeur de ε_{540} proche de 44,0.

Sur la base d'une comparaison avec la méthode de Kjeldahl, Johnson et Swanson[4] ont déjà observé qu'il existe un écart appréciable entre la coloration due aux caséines et celle due aux protéines du lactosérum lors de la réaction du biuret. En chimie clinique, Sizer[7] note que non seulement le pourcentage de transmission à une longueur d'onde donnée, mais également la forme du pic est fonction de la nature et de la concentration des protéines, ce qui n'empêche pas de trouver chez Lieben et Jesserer[8] de même que chez Robinson et Hogden[9] l'affirmation du contraire.

Aucune théorie satisfaisante ne semble avoir été proposée jusqu'ici pour expliquer les différences de $\varepsilon^{\star}$. La connaissance de la structure primaire de chacune de ces protéines[10–13] permet de conclure que ces différences ne proviennent en aucun cas de la seule "densité" des liaisons peptidiques (nombre de ponts peptidiques/poids moléculaire) qui ne varie que très peu d'une protéine à l'autre: $8{,}384 \cdot 10^{-3}$ pour l'α-, $8{,}673 \cdot 10^{-3}$ pour la β-, $8{,}836 \cdot 10^{-3}$ pour la κ-caséine, $8{,}768 \cdot 10^{-3}$ pour la β-lactoglobuline et $8{,}606 \cdot 10^{-3}$ pour l'α-lactalbumine. Le calcul du nombre de sites actifs (atomes d'azote et d'oxygène) capables de fixer du cuivre(II) ne permet pas non plus d'expliquer à lui seul ces différences. Mehl et coll.[14] pensent qu'il faut les attribuer à la nature des acides aminés qui forment les ponts peptidiques. La composition en acides aminés intervient certainement, mais également leur séquence (structure primaire). Ce type d'interprétation n'est pas sans fondement théorique, puisque en un milieu aussi alcalin, surtout en présence de n-butylamine, les structures quaternaires et tertiaires sont détruites (protéines dissoutes par dénaturation), la structure secondaire étant selon toute vraisemblance elle aussi altérée;

---

* Il s'agit de ε apparents puisque calculés à partir d'un $\Delta E = E_A - E_R$ apparent. Si leurs valeurs absolues sont vraisemblablement un peu faibles, leurs valeurs relatives—qui sont intéressantes—sont certainement correctes.

na n'exclut pourtant la possibilité que d'autres structures plus simples se reforment. ns tenter de donner une explication irréfutable de la différence des extinctions es aux protéines lactosériques et aux caséines, on peut formuler quelques hypo-ses quant à ses origines. Intervient sans doute le degré d'"accessibilité" aux ands, variable d'une protéine à l'autre en raison de la solubilité, de la polarité de l'encombrement stérique de ces dernières. Les stoechiométries cuivre(II) otéines et les constantes de dissociation ne sont peut-être pas les mêmes pour ates les protéines et pour les différentes parties d'une même protéine (la stoechio-étrie 1 Cu/4 N ne serait alors qu'une valeur moyenne). En résumé, il semble, e ces différences d'extinctions (pondérales, molaires, *etc.*) résultent de la somme de tites mais nombreuses différences de réaction, dont l'effet global devient sensible.

fluence du lactose

Jusqu'ici, l'influence du lactose sur la réaction dite du biuret n'a été que entionnée. Pour la mise au point générale de la méthode, il est en effet possible, première approximation, de la négliger ou de la considérer comme constante, mais vaut la peine d'étudier son influence sur la réaction.

Le lactose peut intervenir comme réducteur et comme complexant. La action du biuret n'ayant lieu qu'avec le cuivre(II), il faut prévenir la réduction du uivre(II). La dissolution du lait se réalisant en moins d'une minute de chauffage à)°C et la formation du complexe cuivre(II)–protéines se formant en 15–30 min à mpérature ambiante, il est aisé de travailler de façon à minimiser la formation de uivre(I): il suffit de ne pas dépasser ce temps de chauffage, puis de laisser la action se développer à température ambiante. Par contre, la formation du com-lexe cuivre(II)–lactose est beaucoup plus génante, parce que impossible à éviter mplètement sans gêner celle du complexe cuivre(II)–protéines.

L'étude du complexe cuivre(II)/lactose a été effectuée de la manière suivante. xpérimentalement, on effectue la même réaction que précédemment avec 100 μl 'une solution aqueuse ne contenant que du lactose (monohydraté) dont la con-entration croît successivement de 0% à 10% (p/v)*. Les mesures sont effectuées omme précédemment à 540 nm, contre de l'eau, après 30 min de développement de éaction à température ambiante. Comme pour les protéines, la coloration se léveloppe très rapidement pendant les premières minutes pour se stabiliser environ ers 15 à 30 min. Dans le domaine de concentration 0% à 10% (ΔE 0,000 à 0,037), a loi de Lambert–Beer est donc vérifiée, malgré la présence de n-butylamine. Ce hélateur du cuivre(II), bien qu'en grand excès par rapport au lactose, ne peut à lui eul totalement empêcher la formation du complexe cuivre(II)–ose. Les essais précédents montrent pourtant que l'extinction (apparente) due au complexe cuivre(II)–protéines est heureusement bien supérieure à celle due au complexe cuivre(II)–actose: le rapport de ces extinctions apparentes (calcul pour des concentrations en actose et en protéines normales dans un lait frais) est de l'ordre 7 à 8, ce qui ignifie que l'extinction due au complexe cuivre(II)–lactose représente environ 11 à 13% de l'extinction totale (protéines + lactose du lait).

Une telle proportion n'est pas négligeable pour une analyse de précision (ε_{540} = 4/g de lactose monohydraté engagé dans les 100 μl de solution).

* Le lait frais contient approximativement 5% de lactose.

L'enregistrement du spectre d'absorption du complexe cuivre(II)–lactose au moyen du spectrophotomètre à double faisceau P.E.-124/165, contre une solution de référence (blanc) contenant tous les réactifs à l'exception du lactose ($\Delta E_{apparent}$), indique que le maximum se situe à 550–560 nm, au lieu de 535–540 nm pour les protéines. Les pics d'absorption des complexes que forme le cuivre(II) avec les protéines et avec le lactose sont donc presque superposés dans le visible, à la différence près de leur ε (amplitude différente). Enregistrés contre de l'eau, les spectres E_A montrent des maxima situés à *ca.* 695 nm en présence de lactose au lieu de *ca.* 685 nm en présence de protéines (pour le réactif seul: 705 nm). Une telle similitude dans les spectres d'absorption indique une similitude dans la structure des complexes formés.

La quasi superposition des pics d'absorption obtenus rend très difficile l'élimination de l'influence du lactose lors du dosage des protéines selon cette méthode. Si les maxima d'absorption se trouvaient être suffisamment distants l'un de l'autre, il serait possible d'effectuer deux mesures d'extinction aux deux λ_{max} correspondantes, et de corriger les résultats par le calcul. Mais le si faible décalage des pics (env. 10 nm aux λ_{max}) rend inopérante une telle solution. Une destruction chimique ou bactériologique du lactose n'entre pas en ligne de compte parce que ou trop lente ou trop agressive pour les protéines (hydrolyse, solubilité, *etc.*). On peut par contre envisager les quatre possibilités suivantes, qui présentent chacune avantages et inconvénients:

(a) négliger l'influence des variations de la teneur en lactose (et non la teneur en lactose elle-même) sur la détermination des protéines. Cette approximation est encore admissible pour des laits frais normaux ou bien conservés, vu que les variations de la teneur en glucides sont bien inférieures à $\pm 10\%$ relatifs (généralement $\pm 5\%$ relatifs). Si l'on considère de plus la faible contribution du lactose à l'extinction totale (*ca.* 11-13%), on obtient une erreur finale inférieure à $\pm 1\%$ relatif sur le dosage des protéines.

(b) doser parallèlement la teneur en lactose par une autre méthode insensible à la présence des protéines et des graisses, et corriger mathématiquement les résultats obtenus.

(c) engager du lactose ou une substance analogue en quantité telle qu'on sorte du domaine de Lambert–Beer avec la coloration "parasite". La pente de la courbe de réponse extinction/concentration tendant vers zéro, une variation de la teneur en lactose devient alors imperceptible. La glycérine, par exemple, donne un complexe analogue ($\lambda_{max} \simeq 560$ nm), sans présenter un pouvoir aussi réducteur. De plus, elle ne semble pas diminuer la dissolution ou la solubilité des divers composants du mélange. Cette substance a fait l'objet de l'essai suivant: au mélange de réactifs utilisés jusqu'ici, on ajoute encore 1 ml d'une solution de glycérine dont la concentration varie successivement de 0% à 100% (v/v) (les 100 μl d'eau ou de lait ne sont pas engagés). La figure 2 présente les résultats obtenus. Le grand désavantage de cette solution est l'énorme affaiblissement du signal photométrique donné par les protéines. En raison du déplacement des divers équilibres, la pente de la réponse extinction/concentration est réduit de plus des deux tiers. Il serait éventuellement possible de compenser cette perte par une expansion d'échelle ou par amplification par un facteur constant, mais les signaux dus au lactose et au bruit de fond en général sont également amplifiés.

(d) choisir une autre longueur d'onde, par exemple 342 nm, pour laquelle la fférence des coefficients d'extinction des complexes cuivre(II) protéines et cui-e(II)–lactose est plus grande qu'à 535 nm (le ΔE apparent des protéines est viron 2,5 fois plus grand à 342 nm qu'à 540 nm, contre environ 1,4 fois plus and pour la lactose).

fluence de la matière grasse

On ne trouve dans la littérature aucune indication concernant l'influence s lipides. Cela est dû au fait que ces derniers sont normalement absents (pour sérum sanguin) ou qu'on les élimine lors d'une étape antérieure (pour les otéines lactiques) puisqu'ils gènent en raison de la diffusion lumineuse qu'ils ngendrent. Dans le cas d'une dissolution totale du lait entier, il est nécessaire connaître leur influence. Cet essai a été effectué comme les précédents, mais vec 100 μl de différents esters (ester éthylique de l'acide acétique, ester méthylique l'acide laurique, *etc.*), en l'absence de protéines et de lactose. On observe une gère diminution de la coloration finale. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ester es triglycérides pour le lait) est lentement hydrolysé par le milieu. L'acide ainsi béré est saponifié, abaissant légèrement le pH du milieu dont dépendent étroitement s constantes d'équilibre des complexes colorés. Comme pour le lactose, on ne peut égliger l'influence totale de la matière grasse lors d'une analyse de précision— ais l'influence des variations de la concentration de celle-ci ($\leqslant \pm 1\%$ relatif sur la neur en protéines). De plus, l'accroissement de la coloration dû à la glycérine

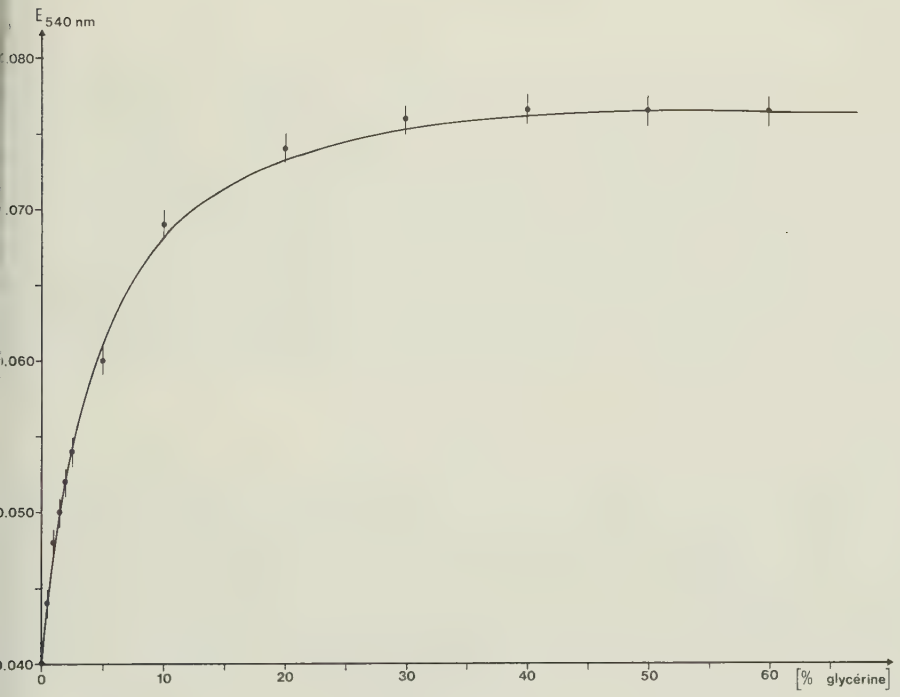


Fig. 2. Influence d'une éventuelle adjonction de glycérine.

libérée simultanément par l'hydrolyse des triglycérides lactiques compense encore l'effet de cette légère acidification. En travaillant à un pH plus élevé, on peut non diminuer la vitesse d'hydrolyse, mais l'influence de cette saponification sur le pH final.

CONCLUSION

A condition de disposer d'un excès de cuivre(II) suffisant (à cause de la n-butylamine), la coloration obtenue suit la loi de Lambert–Beer. Les résultats obtenus ont indiqué que l'extinction finale (mesurée) est fonction dans une certaine mesure de la composition en protéines (les protéines lactosériques ayant un coefficient d'extinction un peu plus élevé que les caséines) et, dans une moindre mesure, de la teneur en lactose et même en matière grasse. De plus, la méthode est relative. Ces considérations suggèrent que le meilleur système d'étalonnage est de prendre comme références (pour établir une droite d'étalonnage) un certain nombre de laits entiers frais analysés (parallèlement) par une autre méthode, absolue, par exemple par un Kjeldahl (PN = TN − NPN). Ainsi est-il possible de compenser dans une très large mesure tous les facteurs qui peuvent influencer le dosage des seules protéines.

Des essais manuels de reproductibilité ont montré que pour des mesures effectuées avec soin on peut atteindre un écart $\leqslant \pm 1\%$ relatif. Ce point sera repris lors de l'application entièrement automatisée de cette méthode, de même que l'étude du coefficient de corrélation avec la méthode de Kjeldahl qui indiquera en définitive dans quelle mesure les petites mais nombreuses approximations proposées dans ce travail sont acceptables, leur effet d'ensemble étant difficile à prévoir.

RÉSUMÉ

Cette deuxième partie indique que, même en présence de n-butylamine, les mesures des extinctions obtenues avec le complexe dit du biuret (pour différentes concentrations en protéines) suivent la loi de Lambert–Beer, à condition que l'excès de cuivre(II) engagé soit suffisant. Les interactions possibles entre les divers complexes colorés entrant en compétition y sont discutées. Une autre étude porte sur la sélectivité de la méthode en comparant les coefficients d'extinction que montre isolément chacune des principales protéines lactiques dans les conditions expérimentales définies précédemment. Une dernière étude est consacrée à la spécificité de la méthode, notamment à l'influence du lactose et des triglycérides présents lors de l'analyse.

SUMMARY

Absorbance measurements of the so-called "biuret complex" at different concentrations of milk proteins obey Beer's law, if copper(II) is used in sufficient excess, even in presence of n-butylamine. The possible interactions between the different coloured complexes are discussed. The selectivity of the method is studied by comparing the absorptivities of each isolated main protein under defined experimental conditions. The effects of lactose and triglycerides, which are the two main interfering compounds of fresh milk, are described and means of overcoming the interferences are discussed.

BLIOGRAPHIE

J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 70 (1974) 327 (Partie I).
H. Salwin, *Food Res.*, 19 (1954) 235.
R. Schober, W. Niclaus et W. Christ, *Milchwissenschaft*, 10 (1955) 238.
B. C. Johnson et A. M. Swanson, *J. Dairy Sci.*, 35 (1952) 823.
P. Baudet et C. Giddey, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 1879.
E. Renner et S. Ömeroglu, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 149 (1972) 335.
I. W. Sizer, *Soc. Exp. Biol. Med.*, 37 (1937) 107.
F. Lieben et H. Jesserer, *Biochem. Z.*, 285 (1936) 36.
H. W. Robinson et C. G. Hogden, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 707.
R. L. J. Lyster, *J. Dairy Res.*, 39 (1972) 279.
J. C. Mercier, F. Grosclaude et B. Ribadeau-Dumas, *Milchwissenschaft*, 27 (1972) 402.
J. Jolles, F. Schoentgen, Ch. Alais et P. Jolles, *Chimia*, 26 (1972) 645.
H. A. McKenzie, *Milk proteins; Chemistry and Molecular Biology*, Vol. II, Academic Press, New York, 1971, pp. 117–215, 255–365.
J. W. Mehl, E. Pakovska et R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 13.

alytica Chimica Acta, 75 (1975) 343–354
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

OUVELLE MÉTHODE DE DOSAGE PHOTOMÉTRIQUE AUTOMA-IQUE DES PROTÉINES DANS LE LAIT ENTIER

ARTIE III. APPLICATION À L'ANALYSE EN FLUX CONTINU

BOSSET et B. BLANC

ation fédérale de recherches laitières, CH-3097 Liebefeld-Bern (Suisse)

PLATTNER

stitut de génie chimique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne CH-1025 – Lausanne (Suisse)

eçu le 16 septembre 1974)

Les bases théoriques ainsi qu'un essai d'application manuelle (optimisation, ude de la linéarité, de la sélectivité et de la spécificité) de la méthode ont fait objet des deux publications précédentes[1,2]. Cette troisième partie présente les sultats obtenus lors de l'application de la méthode à l'analyse dite en flux ntinu.

ARTIE EXPERIMENTALE

iagramme des flux et appareillage

La Figure 1 montre le diagramme des flux et le matériel utilisé pour réaliser "manifold". Le lait, dilué 10 fois avec de l'eau (*cf.* paragraphe "Linéarité"), est jouté au mélange bullé des réactifs (*cf.* paragraphe suivant). La bobine de mélange Technicon 114-0209-01 ou 114-0209-02) est thermostatisée à 70°C pour accélérer dissolution des caséines et surtout de la matière grasse. Le développement de la oloration s'effectue ensuite à température ambiante dans une spirale de réaction en erre* (40 pieds de longueur: 1,6 mm de diamètre intérieur) immergée dans un bac 'eau à température ambiante. Après débullage**, le flux est mesuré à 540 nm dans ne microcellule à flux continu de 50 mm de longueur (Hellma type OS/178). Au lieu e les jeter à l'évier, les solutions mesurées sont stockées, puis distillées pour écupérer la n-butylamine (économie et lutte contre la pollution).

L'appareillage utilisé, choisi en fonction des disponibilités du laboratoire, omprend: un passeur d'échantillon (distributor SD3 de Carlo Erba), une pompe éristaltique (mp 25 GJ-4 d'Ismatec à Zürich), un bain-marie à circulation (K2-D de auda), un spectrophotomètre à double faisceau (124 de Perkin-Elmer), et un nregistreur analogique linéaire (165 de Perkin-Elmer).

Les tuyaux de pompe sont en tygon (ou PVC), à l'exception de ceux qui

* Des essais ont été effectués avec une spirale de réaction en téflon[3].

** Le débulleur C3 est directement connecté à l'entrée de la cuvette de mesure au moyen d'un anchon en caoutchouc au silicone. Ultérieurement, on désignera ce matériau par "silicone".

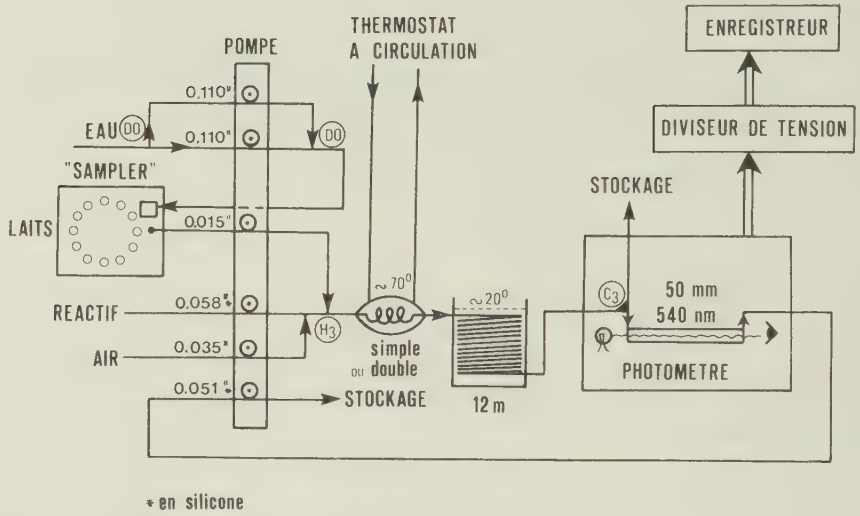


Fig. 1. Diagramme des flux.

entrent en contact avec la n-butylamine (BTA). Ces derniers sont en "silicone", matériau qui, faute de mieux, a été retenu sur la base d'une étude préliminaire[4]. Selon le code de Technicon, il s'agit des types suivants:

– clair/clair (2,65 ml min^{-1}—débit effectivement mesuré avec la pompe utilisée sur le rapport 10), en silicone, pour le réactif;

— orange/vert (1,15 ml min^{-1}), en tygon, pour les laits dilués;

— rouge/rouge (2,00 ml min^{-1}), en tygon, pour l'air (bulles);

— gris/gris (2,00 ml min^{-1}), en silicone, pour le "push-pull";

— violet/blanc (2·9,75 ml min^{-1}), en tygon, pour l'eau de rinçage.

Remarques. (1) Afin d'obtenir l'écoulement le plus rapide possible pour le rinçage de l'installation (accroissement de la cadence des analyses) et le plus régulier possible (amélioration de la précision des résultats), la pompe Ismatec est utilisée à sa vitesse maximale (rapport 10), ce qui multiplie par un facteur 2.5 les débits indiqués par Technicon pour les tuyaux précités.

(2) Ne possédant qu'une seule cellule de mesure en flux continu de 50 mm*, on a équipé le faisceau de référence du photomètre d'un atténuateur d'énergie (diaphragme) pour compenser approximativement l'extinction de la cuvette de mesure remplie avec le blanc (réglage grossier de la ligne de base). Le réglage fin s'opère avec le potentiomètre "zéro. abs." du spectrophotomètre.

(3) Pour faciliter l'évacuation des bulles éventuelles qui peuvent traverser la cuvette de mesure, il est recommandé d'incliner légèrement le spectrophotomètre.

(4) La plus grande sensibilité de lecture est atteinte lorsque les pics enregistrés occupent la plus vaste plage d'enregistrement; on l'obtient en combinant l'expansion d'échelle que permet l'enregistreur (réglage grossier) avec l'adaptation du signal de sortie que permet le petit potentiomètre (diviseur de tension) monté en

* Les volumes pompés étant très supérieurs à celui de la cellule (< 0,2 ml), on peut utiliser une cuvette de 50 mm qui permet de limiter l'expansion d'échelle.

rie. Les divers essais rapportés dans cette étude n'ont pas toujours été réalisés vec le même réglage de ce potentiomètre.)

(5) Les essais effectués à 342 nm (épaule dans l'u.v.) montrent que les extinc- ons obtenus sont trop élevées, ce qui se traduit par un signal peu stable (photo- ultiplicateur trop sollicité) et une mauvaise linéarité; il faut en effet tenir compte de forte extinction produite par la cuvette elle-même ($E \simeq 0{,}85$, en valeur absolue).

omposition du réactif

La stabilité mécanique et chimique des tuyaux de pompe en silicone augmente rsque la teneur en amine diminue[4]. On en déduit qu'il est préférable de mélanger us les réactifs eau, soude, complexonate de cuivre(II) (Siegfried) et n-butylamine Fluka puriss, ou purum)—avant le pompage.

L'expérience indique d'autre part que la qualité du mélange lait/réactif, tant our la dissolution des caséines et des graisses que pour le développement de la oloration, est meilleure lorsque les échantillons de lait sont préalablement dilués. En éalisant cette dilution avec de l'eau dans un rapport 1:10, on diminue notablement e risque d'un dépôt de lait à la sortie du cactus d'injection (H 3) et sur les remières spires de la bobine de mélange. On compense l'effet de cette dilution en nontant un tuyau d'aspiration (des échantillons) de débit approximativement 10 fois lus élevé et en augmentant la concentration des réactifs du biuret de manière à onserver approximativement le rapport des concentrations en protéines, cuivre(II) et oude préconisé pour l'analyse manuelle; pour NaOH, on est limité par les produits le solubilité (démixtion du mélange eau/amine).

Ces quelques remarques ont amené à utiliser, dans le montage définitif, les uyaux de pompe indiqués sur le diagramme des flux. Sur la base de l'optimisation des paramètres effectuée manuellement[1], on en déduit alors la composition suivante pour le réactif: 1 vol. de NaOH 0,6 *M*, 1 vol. d'une sol. (aqueuse) de Cu.EDTA.Na_2.-$2H_2O$ (40 g l^{-1}) (*ca.* 0,1 *M*) et 3 vol. de n-butylamine.

Remarque. Une fois le lait dilué introduit, seule la concentration en n-butylamine se trouve être notablement diminuée (environ de moitié). Les essais effectués ont cependant démontré qu'en maintenant la bobine de mélange à 70°C, une telle concentration de n-butylamine était encore suffisante pour assurer une dissolution complète.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Pour juger de la méthode, les critères suivants ont été retenus: linéarité en présence de quantités variables de lactose; reproductibilité (pour estimer la précision); sensibilité; concordance (coefficient de corrélation) avec la méthode de Kjeldahl admise habituellement comme référence (azote protéique: PN = TN − NPN)[5-7].

La limite de détection n'a pas d'intérêt pratique puisqu'il y a toujours assez de réactant (ponts peptidiques). L'exactitude dépend de la précision et de la qualité de la corrélation, puisque la méthode est relative (solutions étalons).

Etant donné qu'il s'agit d'une méthode d'analyse automatique, une brève étude est encore consacrée à la cadence de travail de l'appareil, ainsi qu'aux divers temps de séjour ou de réaction des échantillons dans l'analyseur.

Les résultats sortent de l'analyseur sous la forme de pics enregistrés (*cf.*

satisfaisante. Néanmoins, on constate non seulement une dérive des pics sur le papie de l'enregistreur, (ce qui ne ressort pas du Tableau II puisqu'il ne donne que l Δh), mais encore une augmentation lente, mais systématique, de la hauteur Δh du p au cours du temps: 22,60 au début; 23,10 après 1 h; 23,25 après 2 h; 23,70 apr 3 h et 23,90 après 4 h. En supprimant les 3 premières mesures qui correspondent à la période de démarrage, de même que les 4 dernières qui ont été obtenu après une correction importante de ligne de base, on peut établir une corrélati relativement bonne entre la position n de l'échantillon dans la série et la hauteur (en cm) du pic correspondant:

$$\Delta h = 22{,}95 + 0{,}021_6\, n$$

avec un coefficient de corrélation égal à 0,911. La valeur 22,95 est la hauteur pic extrapolée à l'origine de l'abscisse.

La cause de cette dérive, très gênante pour l'analyse, doit être recherch dans la variation relativement régulière du débit du tuyau aspirant le réactif. tuyau accuse en effet une plus forte diminution de débit, sous l'influence du solva organique, que le tuyau de tygon, sous l'influence du lait dilué[4]: cela se trad par un changement dans le rapport réactif/réactant. Il en résulte que l'exactitude mesures sera d'autant meilleure que la fréquence des étalonnages sera plus gran (compensation de l'augmentation des Δh). Le Tableau III donne pour ces 43 mêm déterminations la hauteur moyenne des pics $\overline{\Delta h}$, l'écart-type s et le coefficient variation v, calculés heure par heure d'abord*, puis pour tout l'essai d'un bloc.

TABLEAU III

DÉTERMINATION DE $\overline{\Delta h}$ (cm), s ET v

Grandeur	*1ère heure*	*2ème heure*	*3ème heure*	*4ème heure*	*En bloc*
$\overline{\Delta h}$	23,05	23,27	23,56	23,78	23,42
s	0,1343	0,0474	0,1235	0,1059	0,2971
v	0,0058	0,0020	0,0052	0,0045	0,0127

Seul un étalonnage répété chaque heure peut donc permettre une déterminatio reproductible à $\pm 1\%$ relatif. Cette condition, nécessaire mais non suffisante—à caus des brusques modifications de débit des tuyaux de pompe diminue la cadenc d'analyses de l'automate.

Sensibilité

La sensibilité est définie comme le rapport $\Delta(\overline{\Delta h})/\Delta c$, où $\Delta(\overline{\Delta h})$ est l'accroiss ment de la hauteur moyenne du pic $\overline{\Delta h}$, rapportée à la variation de la concen tration en protéines correspondante Δc. L'expérience montre que la sensibilité dépen sensiblement des conditions de travail, notamment de l'âge des tuyaux, surtout d ceux en silicone, de la propreté des conduits, de la qualité des jonctions lors d

* Les 3 premières mesures étant omises, il s'agit des mesures 4–13 pour la première heure, 14–2 pour la deuxième et ainsi de suite.

BLEAU IV

TERMINATION DE LA SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

ncentration lait relatifs)	Hauteur Δh du pic enregistré (cm)				$\Delta(\overline{\Delta h})$ Différence (cm)
	$1^{ère}$ mesure	$2^{ème}$ mesure	$3^{ème}$ mesure	Moyenne	
0	18,3	18,3	—	18,3	0,4
2	18,7	18,8	18,6	18,7	0,4
4	19,0	19,1	19,1	19,1	0,5
6	19,5	19,6	19,7	19,6	0,4
8	19,9	20,0	—	20,0	0,4
0	20,4	20,4	20,3	20,4	

ontage et de la propreté des cuvettes*. Pour une installation très soignée, on arvient à abaisser le seuil de sensibilité jusqu'à 1% relatif, comme le montre le ableau IV, ce qui est indispensable en pratique pour différencier des laits. (On a gnalé, au paragraphe "linéarité", la relativement faible variabilité de la teneur en rotéines des laits normaux. Ce qui était précédemment un avantage devient ici un andicap.) Pour cet essai, les temps d'aspiration et de rinçage sont de 2 min hacun. La sensibilité atteinte $\Delta(\Delta h)/\Delta c$ est donc de 2 mm par 1% relatif de protéines ait entier = 100% relatifs en protéines). On devrait pouvoir l'augmenter encore en igitalisant la lecture photométrique.

Concordance avec la méthode de Kjeldahl

Pour déterminer dans quelle mesure la méthode proposée concorde avec la néthode de référence, celle de Kjeldahl[5,7], 65 échantillons de laits individuels et 9 échantillons de laits de mélange (provenant de 10 vaches au moins) ont été nalysés successivement par l'une et l'autre méthode (*cf.* Fig. 3). Les coefficients e corrélation obtenus sont respectivement $r_{\blacktriangle} = 0{,}950$ et $r_{\bullet} = 0{,}938$. La méthode emble donc applicable aussi bien aux laits de mélange qu'aux laits individuels. Pour 'ensemble des 104 échantillons de laits, sans distinction d'origine, on obtient $=0{,}948$ (droite de regression: g% $PN_{biuret} = 0{,}895$ g% $PN_{Kjeldahl} + 0{,}058$). La concordance obtenue est donc meilleure que celle indiquée par Renner et Ömeroglü[6] our la méthode du biuret. En supprimant 2 valeurs aberrantes, on obtient la épartition statistique suivante: 35% des valeurs obtenues avec la méthode du biuret 'écartent de $\leqslant \pm 1\%$ des valeurs correspondantes obtenues avec la méthode de Kjeldahl, 58% de $\leqslant \pm 2\%$, 76% de $\leqslant \pm 3\%$ et 91% de $\leqslant \pm 4\%$.

Remarque concernant l'étalonnage de l'analyseur. La méthode du biuret étant ne méthode relative, elle nécessite l'emploi de solutions étalons. Vu l'influence constante mais effective) des autres constituants du lait sur ce type d'analyse, il est mportant d'utiliser un lait comme "standard", dont on détermine la teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl[5,7]. Dans ce but, un lait pasteurisé/homogénéisé frais du commerce est particulièrement recommandé: il provient d'une opulation statistique considérable, correspondant donc à un mélange moyen idéal des diverses protéines; du fait de son homogénéisation, sa matière grasse n'écrème

* Il est recommandé de rincer chaque soir l'installation avec un détergent.

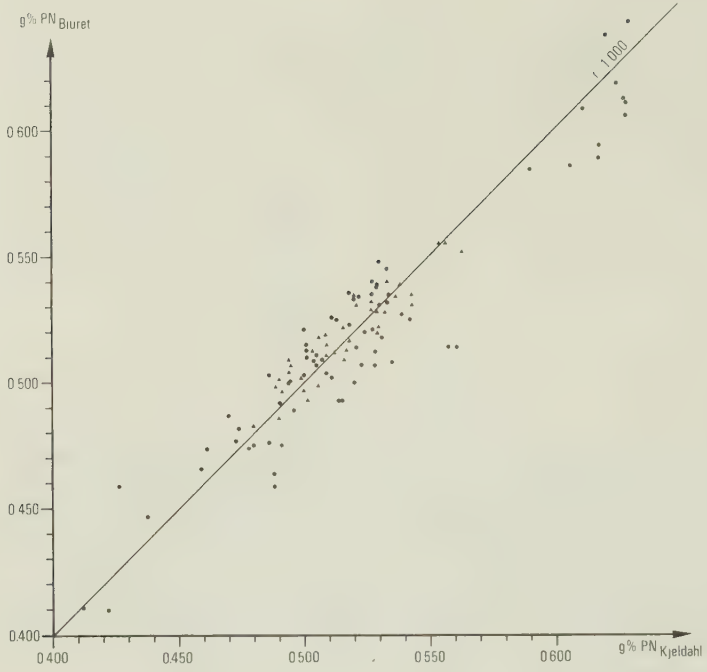


Fig. 3. Concordance entre les méthodes dites du biuret et de Kjeldahl. (●) Lait de mélange; (▲) lait individuel.

pas pendant les mesures et sa conservation est améliorée par la pasteurisation. Pour ne pas avoir à refaire un dosage selon Kjeldahl lors de chaque calibration, le solde de ce lait étalon ("standard") a été surgelé dans l'azote liquide en petites portions et conservé au congélateur. A chaque fois, il a été placé à 3 dilutions différentes (concentrations correspondant à 9°/₀, 10°/₀ et 11°/₀ relatifs) dans le carousel, de manière à passer au moins une fois par heure.

Temps de séjour et de réaction

Les temps de séjour mesurés sont les suivants (pour un rapport de vitesse de pompage = 10 (Ismatec)): *ca.* 1 min pour la spirale de mélange/chauffage simple (14 spires); *ca.* 9 min pour la spirale de réaction.

Si l'on tient compte encore des diverses connections, on dispose au total de plus de 13 min, ce qui est donc suffisant pour atteindre l'équilibre: l'étude manuelle indiquait un temps de réaction de *ca.* 15 min.

Un bref essai consistant à remplacer la bobine de réaction (*ca.* 12 m) par une spirale de mélange double, à 28 petites spires (*ca.* 2 m), a permis d'enregistrer des pics de hauteurs Δh (cm) égales respectivement à 8,4 (au lieu de 9,3 pour 5°/₀ de lait), à 16,7 (au lieu de 17,4 pour 10°/₀) et à 23,1 (au lieu de 24,2 pour 15°/₀), ce qui correspond assez bien au type de cinétique observé lors de l'étude manuelle. Par ailleurs, cet essai a mis en évidence un autre fait, paradoxal à première vue: que l'on emploie la bobine de réaction de 12 m ou celle de 2 m, le temps nécessaire pour atteindre "le palier" ("steady state")—aussi bien lors de l'aspiration de

hantillon que lors du rinçage—reste pratiquement le même. De plus, les pics egistrés ont la même allure. On peut en déduire que la spirale de réaction, en ɔit de sa très grande surface de contact avec le liquide, n'est pas à l'origine de la usion principale (contamination entre segments liquides), qui provoque l'élargisse- nt et le chevauchement partiel des pics enregistrés. La cause la plus plausible de te contamination est à rechercher dans la lenteur du mélange lait/dissolvant à la tie du cactus d'injection H3. On remarque en effet que les deux flux adjacents se ɔlacent relativement longtemps à vitesses inégales, vu leur différence de densité. outre, chaque connection verre verre ou verre nipple au moyen d'un manchon une source de contamination supplémentaire. La seule solution vraiment parfaite nsisterait à tout souder, ce qui est impensable pour un appareil de recherche. ıalement, l'écoulement du fluide non segmenté depuis le débulleur jusqu'au sceau optique est également un facteur de contamination, d'autant plus important e les diamètres intérieurs de la branche sortie du débulleur et de l'entrée ns l'ultramicrocuvette sont différents. C'est au niveau de ces divers éléments que n pourrait intervenir pour augmenter la cadence des analyses sans perdre en solution des pics, comme le montre le paragraphe suivant.

ıdences des analyses

Le Tableau V donne la hauteur des pics obtenus Δh en fonction de la cadence s analyses (t_a = temps d'aspiration de l'échantillon; t_r = temps de rinçage à l'eau). échantillon est un lait dilué 10 fois. La qualité de l'analyse—d'autant meilleure que prélèvement d'échantillon et le rinçage sont quantitatifs—va donc à l'encontre de la ıantité d'analyses effectuées par heure. Les valeurs $t_a = t_r = 3$ min (= 10 analyses/h) présente un bon compromis. On pourrait admettre à la rigueur $t_a = t_r = 2$ min avec 3% du pic intégral (= 15 analyses/h).

ABLEAU V

FLUENCE DE LA CADENCE DES ANALYSES

(min)	*t_r (min)*	*$\overline{\Delta h}$ (cm)*	*$\overline{\Delta h}/h_{max}$ (%)*	*Nbr. anal./h*
5	0,5	1,5	8	60
)	1,0	5,5	31	30
5	1,5	11,5	64	20
)	2,0	14,9	83	15
)	3,0	17,2	96	10
5	4,5	18,0[a]	100	$6\frac{2}{3}$
)	6,0	18,0[a]	100	5

Plateau atteint ("steady state"): $h_{max} = 18{,}0$ cm.

ISCUSSION ET CONCLUSION

La méthode proposée dans ce travail, comme n'importe quelle autre, présente es qualités et des défauts.

Au compte de ses avantages, on peut citer sa simplicité, sa sensibilité, sa écificité, l'influence du lactose et de la matière grasse s'avèrant suffisamment

constante. La méthode ne nécessite qu'un nombre minimum de modules (passeur d'échantillons/pompe/bobines de mélange et de réaction/colorimètre/enregistreur) évitant l'emploi délicat du dialyseur nécessité par les méthodes au "dye-binding" ou du minéraliseur requis pour la méthode de Kjeldahl[9,10]. Elle n'exige aucun traitement préliminaire, si ce n'est une dilution d'un facteur 10 avec de l'eau, opération que l'on pourrait également automatiser en flux continu.

Au compte des points critiques, il faut signaler surtout la résistance par trop variable des tuyaux de pompe en silicone. L'expérience a montré que pour un même lot de tuyaux (paquet de 6 pièces) les uns lâchent très vite (de quelques minutes à quelques heures), alors que d'autres peuvent résister une à deux semaines sans interruption. Ces tuyaux se déforment plus ou moins vite, ce qui se traduit par une dérive gênante tant de la ligne de base que de la hauteur des pics enregistrés pour une concentration donnée. La reproductibilité et par conséquent la fiabilité de la méthode peuvent être mises en cause. Il s'agit en fait d'un problème de technologie des plastiques et non de méthodologie. L'avenir de cette méthode dépend dans une grande mesure des possibilités de substitution des tuyaux en silicone, notamment de celui qui injecte le réactif, par des tuyaux moins sensibles au vieillissement mécanique et chimique ou par un autre dispositif de pompage équivalent. Un essai a été tenté en ce sens, consistant à injecter le réactif par une pompe à deux pistons à "débits compensés" (pompe Ismatec pmp-10, CH-Zürich), mais le flux obtenu ne s'est pas avéré suffisamment constant pour donner satisfaction.

L'analyse en discontinu automatique est peut-être une autre solution à ce problème puisqu'elle ne requiert que des pompes à piston inattaquables (verre et téflon en général). De plus, la cadence d'analyses de tels automates est beaucoup plus élevée, ce qui est dû au fait que la diffusion (la "contamination") entre échantillons est presqu'inexistante.

Les grandes variations du coefficient de corrélation biuret/Kjeldahl, calculé pour les diverses séries* de lait, qui passe de 0,90 (médiocre) à 0,98 (très bon) s'explique vraisemblablement en partie par cette instabilité du système de pompage. Dans la situation actuelle, une multiplication des tests de corrélation ne se justifie donc pas.

Quelles que soient les améliorations que l'on puisse apporter au dispositif expérimental, le coefficient de corrélation ne vaudra pourtant jamais exactement 1,000 en raison des différences des coefficients d'extinction des différentes protéines[2].

Cette dernière réflexion amène à repenser la définition de la "teneur en protéines totale". Ce terme recouvre en effet un vaste ensemble d'éléments variés, impossible à caractériser par un poids moléculaire ou une formule brute. Il ne s'agit pas d'une entité précise, univoquement définie: l'extension et la compréhension de ce concept est fonction du critère analytique choisi. Et ces critères sont nombreux: teneur en liaisons peptidiques (biuret ou absorption à *ca.* 210 nm), teneur en azote (TN ou PN selon Kjeldahl ou selon Dumas), capacité de fixer un colorant en donnant un complexe insoluble (méthode au "dye-binding"), pouvoir absorbant des fonctions amides à *ca.* 1530–1548 cm^{-1} (dosage dans l'infra-rouge), insolubilité dans certains milieux (précipitation dans CCl_3COOH à 12°$_0$ ou avec des sels de métaux lourds), absorption à *ca.* 280 nm due aux acides aminés aromatiques (dosage dans l'ultra-

* Pour des raisons pratiques, les 104 laits ont été analysés en 7 séries consécutives.

let) ou à tel ou tel acide aminé donnant une réaction colorée, teneur en acides inés totale après hydrolyse (dosage à la ninhydrine), "titrabilité" de certaines fonc- ns (dosage à la formaldehyde), réponse immunologique, etc. Le problème a déjà soulevé lors de l'étude de la spécificité et de la sélectivité de cette méthode[2].

SUMÉ

Les auteurs présentent les résultats de l'application de la méthode dite du iret à l'analyse automatique en flux continu. La méthode est d'une grande nplicité. La spécifité de la réaction est acceptable: l'influence du lactose et des ides est en effet suffisamment constante pour être compensée par un étalonnage l'analyseur au moyen d'un lait "standard" à teneur en azote protéique connu. loi de Lambert Beer est vérifiée. La sensibilité permet de différentier des laits à neur en protéines différant de moins de 2% relatifs. La reproductibilité d'analyses double ou à triple consécutives est satisfaisante (*ca.* ±1%). Par contre, la bilité du flux du réactif pose encore certains problèmes technologiques. Les tuyaux pompe, même en silicone, sont en effet trop peu résistants au vieillissement imique et mécanique qu'occasionne la forte concentration en *n*-butylamine requise ur dissoudre intégralement le lait. Une série de tests est ensuite consacrée à tude de la concordance avec la méthode de Kjeldahl; le coefficient de corrélation tenu pour 104 déterminations à double est $r = 0{,}950$. Les temps de réaction et nfluence de la cadence des analyses font encore l'objet de quelques essais com- émentaires ($\leqslant 15$ analyses/h).

MMARY

Results obtained from the application of the so-called biuret method to an tomatic continuous flow analyzer are presented. The method is of great simplicity. he "specificity" of the reaction is acceptable: the influence of lactose and lipids is nstant enough to be compensated by a calibration of the automatic analyzer by eans of a "standard" milk of known protein nitrogen content. Beer's law is valid: e sensitivity is sufficient to differentiate between milks differing relatively in protein ncentration by at least 2%. The repeatability of consecutive double or triple nalyses is usually satisfactory (*ca.* ±1%). The stability of the reagent flow poses me technological problems however: the pump tubings, even in silicone, are not ery resistant to chemical and mechanical wear, owing to the high concentration f n-butylamine necessary completely to dissolve the milk. The correlation with the jelahl method was studied, the correlation coefficient being $r = 0.95$ ($N = 104$ uplicate determinations of individual and pooled milks). The reaction time and the fluence of the rate of analyses were also studied ($\leqslant 15$ analyses per h).

IBLIOGRAPHIE

1 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 70 (1974) 327.
2 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 71 (1974) 97.
3 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 75 (1975) 474.
4 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 68 (1974) 331.

5 *Schweiz. Lebensmittelbuch*, Bd. II, *5. Aufl.*, Eidg. Drucksachen und Materialzentrale, Berne 1969, Kap. I. Methode 21, pp. 22–33.
6 E. Renner et S. Ömeroglŭ, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 149 (1972) 335.
7 J. Bosset et G. Steiger, *Mitt.-Gebiete Lebensm. Hyg.*, 65 (1974) 470.
8 A. Conetta, L. Stookey et H. Zehnder, *Technicon International Congres 1970, Advances in Automated Analysis, Vol. II*, Median Incorporated, New York, 1971, pp. 81–85.
9 W. Schulz, *Technicon Symp. 1966, Automation in Analytical Chemistry, Vol. II*, Median Incorporated, New York, 1967, pp. 63–65.
10 G. J. Brisson, *Technicon Symp. 1965, Automation in Analytical Chemistry*, Median Incorporated, New York, 1966, p. 54–56.

alytica Chimica Acta, 68 (1974) 331–337
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

TUDE DE LA STABILITÉ CHIMIQUE ET MÉCANIQUE DES TUBES DE OMPES TECHNICON LORS DE L'EMPLOI DE SOLVANTS ORGA-IQUES TRÈS AGRESSIFS (AMINES ET ÉTHERS)*

BOSSET et B. BLANC
ation Fédérale de Recherches Latières, 3097 Liebfeld–Bern
PLATTNER
stitut de Génie Chimique, École Polytechnique Fédérale, Lausanne (Suisse)
eçu le 31 juillet 1973)

En dépit de nombreuses améliorations, l'un des points les plus délicats es systèmes d'analyse automatique dits "à flux continu" reste toujours le dis-ositif de pompage. Ce "coeur" assure à lui seul le prélèvement de l'échantillon, ou les dilution(s) nécessaire(s), l'introduction des réactifs et la circulation énérale des fluides dans tout le système (bobines de mélange, de thermostatisation de réaction, modules de dialyse, de filtration, de séparation, etc.), le passage u travers de la cuvette de mesure ("push–pull"), sans oublier encore l'importante egmentation (bulles) des échantillons. L'ensemble de ces opérations, qui représente puvent une perte de charge considérable, doit pourtant être très précis ($\pm 1\%$), apide (cadence de 10^1 à 10^2 (analyses h^{-1})) et constant (pas ou très peu de érive dans le temps, surtout avec une expansion d'échelle).

Ces quelques considérations conduisent à une conclusion impérative: les ubes de pompe utilisés doivent présenter une résistance chimique et une stabilité nécanique excellentes. Paradoxalement, vu le nombre important de publications nalytiques traitant de l'automatisation au moyen de tels équipements, très peu l'entre elles abordent ce point de première importance. Quelques auteurs[1–3] herchent à corriger mathématiquement la dérive des résultats obtenus au moyen l'ordinateurs. Cooke et Stockwell[4] étudient ce problème en travaillant avec de eau et des solutions eau/alcool (éthanol, n-propanol, isopropanol, à diverses oncentrations) pour des tubes "standard" et "solvaflex". Davidson *et al.*[5] examinent e cas des tubes "acidflex" avec un acide concentré (l'acide sulfurique à 90%).

Types de tubes de pompe existants et domaines d'application

Pendant de nombreuses années, on ne trouvait sur le marché que trois ypes de tubes de pompe différents: les "standards" (PVC ou tygon), les "acidflex" t les "solvaflex". Récemment, Technicon vient de mettre sur le marché trois ouveaux types de tubes:

* Cette publication est dédiée au Professeur D. Monnier, à l'occasion de son 70ème anniversaire. xtrait d'une thèse de doctorat publiée prochainement sous la direction des Prof. Dr. B. Blanc t E. Plattner.

les nouveaux "standards" ("SMA flow-rated pump tubes");
les nouveaux "acidflex" (de couleur rouge, au lieu de noire);
les "silicones".

En se basant sur les spécifications données par le fabricant, il apparaît que le système de pompage péristaltique ne doit pas poser de problèmes particuliers en ce qui concerne[6]:

les alcools et les acides aliphatiques à chaînes relativement courtes;
les aldéhydes et les cétones ordinaires lorsqu'elles sont assez diluées;
les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, même nitrés ou chlorés;
les acides minéraux même concentrés;
les acides et les bases (organiques ou inorganiques) dilués et de manière générale toutes les solutions où l'eau joue le rôle déterminant.

Il n'est fait mention nulle part de deux classes de solvants particulièrement importants: les amines et les éthers. Parmi eux, deux représentants courants, la n-butylamine (BTA) et le tétrahydrofurane (THF), feront plus particulièrement l'objet de ce travail.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET MODE OPÉRATOIRE*

Les différents tubes à essayer sont montés sur une pompe Technicon II selon la technique habituelle.

Afin de simuler des conditions de travail réelles (écrasement des tubes, charge de la pompe, etc.), les tubes de pompe à tester sont montés parallèlement à d'autres tubes "standards" qui assurent simultanément la circulation d'autres flux (air, eau). La température est celle du laboratoire, les variations étant inférieures à ± 1°.

Le solvant (BTA ou THF) employé à 60% (v/v) (les 40% (v/v) restant sont de la soude 0.4 *M*) est placé dans un erlenmeyer de 200 ml, connecté à la pompe au moyen de tuyaux d'aspiration et de retour en téflon. Le système travaille en circuit fermé avec un minimum d'évaporation. Chaque heure, on mesure le débit de chacun des tubes en chronométrant le temps nécessaire pour remplir un ballon jaugé de 20 ml. Les solutions de BTA et de THF sont périodiquement renouvelées (indiqué par une petite flèche verticale descendante sur les graphiques).

Cette étude a été effectuée sur des tubes de débit Q et de diamètre d moyens, indiqués dans le Tableau I.

Les divers essais ont été poursuivis en principe jusqu'à destruction du tube de pompe (dissolution, rupture, obstruction, écrasement ou relâchement complet) repérée par une croix ($\times$) sur les Figures. Pour les tubes qui, au contraire, ont montré dès le début une bonne résistance à l'usure et au vieillissement tant chimique que mécanique, les tests ont été menés jusqu'à preuve de leur stabilité, c'est à dire au minimum sur 150 h de fonctionnement ininterrompu.

Les tuyaux ont tous été montés avec une tension moyenne (supports en position médiane). Après un certain nombre d'heures de fonctionnement ininterrompu (54 ou 77 h suivant les cas), ils ont été retendus d'un cran, afin

* Sauf indications spéciales, celles données par Cooke et Stockwell[4] sont valables.

ABLEAU I

UBES UTILISÉS POUR CETTE ÉTUDE[a]

atériau	Type	$Q(0)$ (ml min^{-1})[b]	d (inch)[c]
ilicone"	Clair clair	1.27	0.058
olvaflex"	Jaune bleu	1.27	0.060
tandard"	Jaune jaune	1.15	0.056
cidflex noir"	Bleu bleu	1.28	0.065
cidflex rouge"	Jaune jaune	1.00	0.056

Aimablement mis à disposition par Technicon International.
$Q(0)$ = débit mesuré en début d'essai (première mesure).
d = diamètre intérieur selon indications de Technicon.

e pouvoir estimer l'influence de la tension sur le débit (discontinuité représentée ar une verticale sur les graphiques).

Remarque. Pour des raisons de sécurité, la pompe a été arrêtée pendant première nuit d'utilisation de nouveaux tubes, c'est à dire après 4 h de nctionnement. Les tuyaux, vidés de leur contenu, ont été maintenus sous tension, ais le couvercle assurant la pression a été enlevé.

ÉSULTATS ET DISCUSSION

Les temps de remplissage $T(t)$ mesurés en fonction de la durée de l'essai (h) ont été convertis par ordinateur en:

$Q(t)$: le débit du tube de pompe (ml min^{-1}) au temps t(h).
$Q(t)/Q(0)$: le rapport de ce débit au débit initial ($t=0$) (sans dimension).

ABLEAU II

ÉSUMÉ DES OBSERVATIONS FAITES

Matériau	*Solvant*	*Durée vie (h)*	*Observations et remarques*
Silicone"	Eau	$\gg 200$	Aucune modification significative de la couleur, de
Standard"	Eau	$\gg 200$	l'élasticité ou de la forme des tubes, si ce n'est un
Solvaflex"	Eau	$\gg 200$	léger aplatissement après un grand nombre d'heures de
Acidflex"	Eau	$\gg 200$	travail.
Silicone"	BTA	$\gg 200$	Aplatissement marqué, état lég. vitreux.
Standard"	BTA	~ 175	Apparition d'une forte coloration jaune-brun.
Solvaflex"	BTA	~ 50	perte d'élasticité, durcissement, écrasement.
Acidflex"	BTA	25–30	Gonflement, lég. décoloration, ramollissement.
Silicone"	THF	$\gg 200$	Pas de modifications significatives.
Standard"	THF	~ 0	Dissolution totale en quelques minutes,
Solvaflex"	THF	~ 0	aucune résistance chimique.
Acidflex"	THF	~ 5	Gonflement, décoloration, ramollissement.

$d[Q(t)/Q(0)]/dt$: la dérivée de ce rapport par rapport au temps, caractérisant la variation horaire de ce débit (‰ par h).

Le rapport $Q(t)/Q(0)$ en fonction de t pouvant être considéré comme l'un des critères les plus significatifs de la qualité des divers tubes testés, les résultats obtenus sont présentés sous la forme de trois graphiques (Figs. 1–3) correspondant aux trois solvants proposés: l'eau, la n-butylamine et le tétrahydrofurane. Les valeurs de $Q(0)$ étant donnés dans le Tableau I, il est possible d'en déduire $Q(t)$; quant à la dérivée, elle est donnée par la pente des graphes.

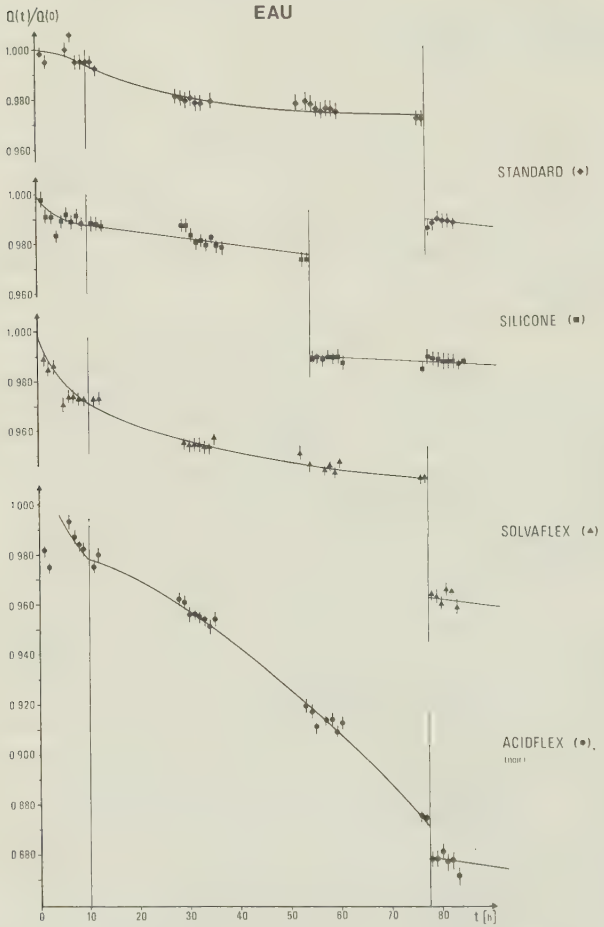
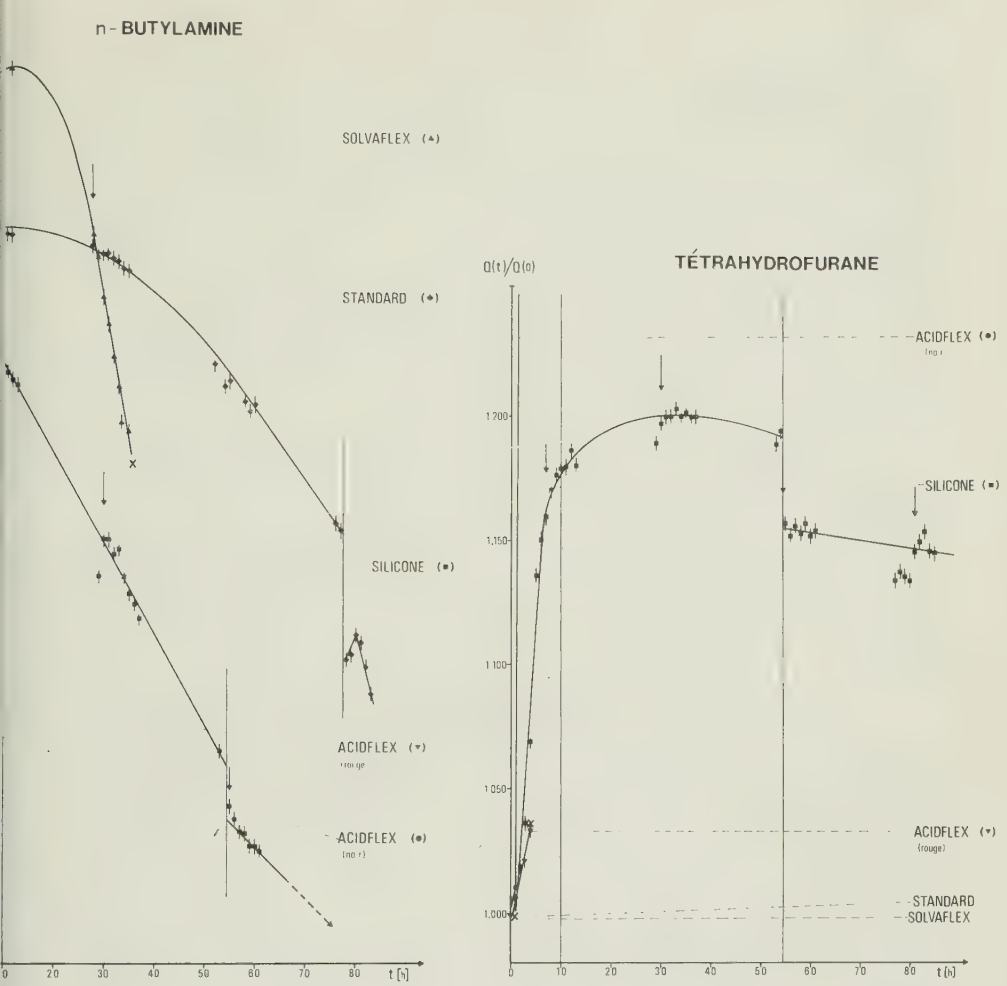


Fig. 1. Stabilité mécanique lors du pompage d'eau distillée.

Les échelles utilisées étant toujours les mêmes, le mode de représentation adopté permet de comparer directement le comportement des divers matériaux disponibles pour un solvant donné, et l'influence des divers solvants proposés sur un matériau donné. Pour une variation de débit de 1‰ (≙une graduation de l'axe des ordonnées), on lira en abscisse l'intervalle de temps maximum tolérable entre deux étalonnages successifs. Les domaines d'erreur indiqués sur



ig. 2. Stabilité chimique et mécanique lors du pompage d'une solution de n-butylamine concentrée 50% v/v).

ig. 3. Stabilité chimique et mécanique lors du pompage d'une solution de tétrahydrofurane con-entrée (60% v/v).

es graphiques correspondent à $\pm 3^{\circ}/_{oo}$ pour $T(t)$. Les autres erreurs sont négligeables u interviennent sur des valeurs constantes.

En complément, le Tableau II résume les observations faites sur les divers ubes à la fin des essais.

Conclusion

La résistance tant mécanique que chimique des divers tubes de pompe isponibles varie énormément avec le matériau et le solvant utilisés, comme indique le Tableau III.

On peut conclure que:

TABLEAU III

VARIATION TOTALE DE $Q(t)$ ENTRE $t=80^a$ ET $t=150$ POUR LES DIVERS TUBES D POMPE DISPONIBLES

Solvant	*Silicone*	*Standard*	*Solvaflex*	*Acidflex*
Eau	7°/₀₀	0°/₀₀	32°/₀₀	59°/₀₀
BTA (60%)	100°/₀₀	234°/₀₀	—[b]	—[b]
THF (60%)	5°/₀₀	—[b]	—[b]	—[b]

[a] Le temps nécessaire pour stabiliser le tube est largement atteint. [b] Tube détruit.

avec l'eau, il n'y a pas d'attaque chimique du matériau. Seule la résistan mécanique à l'usure joue un rôle dans le choix de ce dernier. On retiendr donc le tube "standard", pour son prix également.

avec la n-butylamine et le tétrahydrofurane, les deux facteurs interviennen de manière conjuguée, limitant de façon beaucoup plus nette la durée de vie d tubes. On retiendra donc le tube "silicone".

Pour des concentrations encore plus élevées en n-butylamine et en tétra hydrofurane, les tubes en "silicone" sont encore acceptables, mais leur dur d'utilisation en est d'autant plus réduite.

RÉSUMÉ

La résistance à l'attaque chimique et à l'usure mécanique des "tube (tuyaux) de pompe Technicon a été étudiée lors de l'emploi de solution aqueuses riches en solvants organiques hétéropolaires, tels la n-butylamine et tétrahydrofurane. Les résultats des mesures de débit effectuées sur plus de 200 avec des tubes en "tygon" (ou PVC), en "solvaflex", en "acidflex rouge", "acidf noir" et en "silicone" indiquent que seul ce dernier matériau est acceptab pour les solvants précités. Avec les autres tubes, on arrive très rapidement la dissolution, au relâchement complet ou à la rupture. Une comparaison effectu dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée permet d'apprécier l'importan respective de l'attaque chimique et de l'usure mécanique.

SUMMARY

The resistance of Technicon pump tubing to mechanical usage and chemica attack was studied for aqueous solutions rich in heteropolar organic solven such as n-butylamine and tetrahydrofuran. The results of flow-rate measure ments, over 200 h, with "tygon" (PVC), "solvaflex", "acidflex" (black/re and "silicone" tubing indicate that only the last is acceptable for use with t above-mentioned solvents. With the other types of tubing there is rapid solubil zation, deformation or rupture of the material. A comparison carried out und identical conditions with distilled water allows the respective importance of chemic attack and mechanical usage to be assessed.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die chemische und mechanische Beständigkeit von Schläuche

wie sie für Technicon Pumpen gebräuchlich sind, bei der Verwendung von konzentrierten wässerigen Lösungen heteropolarer organischer Lösungsmittel (n-Butylamin und Tetrahydrofuran) untersucht. Die Messung der Durchflussmessungen über mehr als 200 Stunden bei Schläuchen aus "Tygon" (PVC), "Solvaflex", "Acidflex rot", "Acidflex schwarz" und "Silikon" ergaben, dass einzig "Silikon"-Schläuche bei der Verwendung der oben erwähnten Lösungen eine brauchbare Lebensdauer aufweisen. Bei allen anderen Materialien erfolgte eine mehr oder weniger rasche Erweichung und Auflösung oder ein Zerreissen der Schläuche. Eine unter gleichen Bedingungen durchgeführte Untersuchung mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel zeigte, welche Veränderungen durch chemische Einwirkungen und welche durch mechanische Beanspruchung und Alterung des Materials verursacht werden.

BIBLIOGRAPHIE

1 M. A. Blaivas and A. H. Mencz, *Automation in Analytical Chemistry: Technicon Symposium, 1966*, Vol. 1, Mediad Inc., New York, 1967, pp. 368–372; *Technicon Symposium, 1967*, Vol. 1, 1968, pp. 133–136.
2 H. E. Gould and A. Brooks, *Automation in Analytical Chemistry: Technicon Symposium, 1966*, Vol. 1, Mediad Inc., New York, 1967, pp. 378 382.
3 H. E. Gould, *Automation in Analytical Chemistry: Technicon Symposium, 1967*, Vol. 1, Mediad Inc., New York, 1968, pp. 141–146.
4 J. R. Cooke and P. B. Stockwell, *Lab. Pract.*, 20 (2) (1971) 125.
5 J. Davidson, J. Mathieson and A. W. Boyne, *Analyst*, 95 (1970) 181.
6 Technicon, *General Operating Instruction Manual*, Section M, p. 11.

Analytica Chimica Acta, 75 (1975) 474–477
© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

SHORT COMMUNICATION

Important phénomène de surface observé en testant une spirale de réaction en téflon montée sur un analyseur automatique à flux continu

J. BOSSET et B. BLANC

Station fédérale de recherches laitières, CH-3097 Liebefeld-Bern (Suisse)

E. PLATTNER

Institut de génie chimique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse)

(Reçu le 16 septembre 1974)

Lors des essais de mise au point de deux nouvelles méthodes d'analyse automatique en flux continu (type Auto-Analyzer, Technicon), en l'occurence le dosage du lactose par potentiométrie différentielle[1] et celui des protéines du lait par photométrie[2], la très classique spirale de réaction de verre (Technicon, 40 feet, 1,6 mm i.d.) a été remplacée, à titre d'essai, par une spirale analogue en téflon bobinée au laboratoire avec du tuyau de PTFE. Cette solution présentait en effet de notables avantages, notamment:

— un coût extrêmement modique,
— un matériau incassable, aisé à remplacer si nécessaire,
— une contamination minimale d'un échantillon à l'autre vu le caractère peu "mouillable" du matériau,
— la possibilité de choisir exactement la longueur et le diamètre intérieur du tube de téflon (temps de réaction),
— la possibilité de choisir la forme à donner à la spirale (adaptation à n'importe quel type de bain marie),
— une résistance chimique égale à celle du verre.

On peut rappeler, dans le même ordre d'idées, la proposition de remplacer les bobines de mélange de verre par des bobines de polyéthylène[3].

En dépit de nombreuses tentatives, cette nouvelle formule technologique a dû néanmoins être abandonnée pour une seule et unique raison: le régime d'écoulement du flux bullé a une trop forte tendance à pulser à la sortie d'une telle spirale de réaction, bien que l'écoulement à l'entrée de cette spirale soit relativement régulier, puisqu'imposé par la pompe péristaltique.

Description du phénomène

En observant les trains de bulles, le phénomène peut être décrit comme suit: une quelconque petite diminution du débit—donc de la vitesse—du flux entraîne une légère augmentation de la résistance, qui va diminuer un peu plus le débit, et ainsi de suite par récurrence jusqu'à l'arrêt quasi complet du flux à la sortie de la spirale. Comme cette dernière continue a être alimentée en amont par

la pompe, la pression augmente progressivement (ce qui se traduit par une compression des bulles) jusqu'à une valeur critique suffisante pour débloquer le flux. Aussitôt que ce dernier se remet à couler, la résistance diminue, donc la vitesse et le débit augmentent fortement et ainsi de suite par récurrence jusqu'à la disparition presque totale de la surpression. A ce moment, la vitesse recommence à décroître et le cycle peut se répéter. A la limite, il semble qu'il n'y ait que deux types d'écoulements stables possibles, discrets: l'écoulement minimum (presque nul) et l'écoulement maximum. Le système dit à flux "continu" oscillerait constamment entre ces deux extrêmes: la moindre variation primaire de débit peut donc être amplifiée dans des proportions considérables par ce mécanisme. On conclut donc que dans une telle spirale, la vitesse n'est pas seulement fonction de la différence des pressions entre l'entrée et la sortie de la spirale, mais encore d'un coefficient de friction lui-même fonction de la vitesse.

Influences de quelques paramètres importants

Sans chercher à traiter le sujet de manière quantitative et exhaustive, on peut caractériser l'influence des principaux paramètres qui interviennent dans ce phénomène.

Segmentation. Le phénomène ne se produit pratiquement que lorsque le flux est segmenté. Si l'on remplace le flux d'air (bulles) par un flux d'eau—les autres facteurs restant inchangés—les pulsations disparaissent. Une série d'essais complémentaires a été réalisée avec une spirale de téflon du même type (6 m de long; 1,8 mm i.d.) que l'on alimente par de l'eau (sans bulles) provenant d'un réservoir maintenu successivement sous diverses pressions par de l'air comprimé. Les résultats obtenus montrent que le débit est directement proportionnel à la perte de charge, ce qui est en accord avec la loi de Poiseuille et confirme que le liquide est newtonien.

Il semble qu'il faille rechercher l'origine de ce phénomène dans une modification du système des 3 vecteurs qui symbolisent les tensions interfaciales liquide–air, air–téflon et téflon–liquide. Cette dernière joue un rôle considérable vu l'extrême hydrophobicité du téflon. Outre les deux nouveaux interfaces qu'elles engendrent (air–liquide et air–téflon), les bulles interviennent par leur compressibilité. Preuve en soit l'essai suivant: pour régulariser le débit, un "pulse chamber" (Technicon PCl, no 116–0120) a été monté entre la pompe et la spirale de téflon. Contrairement à ce qui pouvait laisser supposer une telle désignation, l'amplitude des pulsations du flux a fortement augmenté et leur fréquence a baissé.

Pour des conditions de travail données, la période du système pulsé est très constante.

Vitesse de pompage. La tendance à pulser décroît fortement lorsque la vitesse de pompage (pompe péristaltique Ismatec (CH-Zürich), modèle mp 25 G J-4) augmente. Au-delà d'une certaine vitesse critique, les pulsations ne peuvent même plus s'amorcer ou deviennent négligeables. Mais dans de telles conditions, la spirale de réaction devient toujours moins intéressante en tant que telle.

Température. Ce facteur est capital. Si le phénomène peut déjà se produire à température ambiante, il croît fortement avec la température, ce qui s'explique vraisemblablement par une diminution de la viscosité du fluide en mouvement (frottements "amortisseurs" contre les parois), peut-être aussi par une modification des tensions interfaciales.

Tension superficielle. Si l'on ajoute quelques % de détergent (Teepol de Shell) à l'un des flux, l'écoulement s'en trouve d'abord notablement amélioré (on observe alors une légère mousse à la sortie du débulleur). Pourtant, après un certain temps d'utilisation (de quelques minutes à quelques heures, selon la concentration utilisée), le phénomène peut réapparaître, même fortement amplifié. Lors d'un lavage ultérieur de la spirale sans détergent (surtout si la concentration précédemment utilisée était forte), l'écoulement peut se restabliser momentanément.

Un tel comportement semble indiquer que dans une première étape, le tensio-actif — distribué de façon homogène dans le flux — commence par améliorer le contact du flux avec le téflon. Le comportement de ce matériau tend à s'apparenter à celui du verre. Puis le détergent pourrait s'accumuler à l'interface, modifiant du tout au tout le régime d'écoulement. Le lavage provoquerait la désorption du tensio-actif qui repasserait momentanément à une concentration idoine.

A l'inverse du téflon, la spirale de verre s'est en effet avérée être un régulateur de débit, les variations de débit (que l'on peut suivre grâce aux bulles) étant nettement plus fortes au début qu'à la fin de la spirale.

Dimensions de la spirale. Bien qu'intervenant dans les pertes de charge, la longueur et la section du tube de téflon ne semblent pas jouer un rôle important. Il faut évidemment une longueur minimale pour que le processus apparaisse (quelques m), au-delà de laquelle ce dernier ne varie guère. On a obtenu des pulsations analogues avec des spirales de 3, 6, 12 et 18 m.

Etat de surface. L'état de surface (interne) du téflon intervient aussi. Afin de diminuer sa rugosité, la spirale a été chauffée pendant 10 min à 380°C, c'est à dire au-dessus de son point de fusion, puis refroidie très lentement jusqu'à température ambiante, afin de favoriser une certaine cristallisation du PTFE. Un tel traitement améliore sensiblement l'écoulement du flux bullé, sans supprimer toutefois les pulsations.

Conclusion

Il ressort de cette brève étude que le téflon (PTFE) se prête assez mal à la réalisation de spirales de réaction d'une certaine importance, vraisemblablement en raison de sa forte hydrophobicité. Le flux qui doit être continu et régulier—aux à-coups près dus à la pompe—se met à pulser à la sortie d'une telle spirale, ce qui se fait sentir depuis l'introduction de l'échantillon (rapport non constant avec le réactif) jusqu'au débullage et à la détection. Le phénomène est particulièrement sensible avec une méthode de mesure électrochimique, où les potentiels électrocinétiques ne peuvent être négligés. L'emploi de matériaux synthétiques moins hydrophobes, à résistance comparable, devrait permettre de sauvegarder les avantages de la spirale de téflon (*cf.* début) tout en limitant au maximum ses inconvénients.

L'emploi d'un tube de téflon analogue à celui de la spirale étudiée s'est avéré par contre des plus avantageux pour remplacer les connections en tygon ou PVC ("transmission tubing") lors de la construction du manifold. Ces connections sont en effet suffisamment courtes pour que les pulsations ne puissent s'y générer.

Les constatations rapportées dans cette brève communication sont confirmées par l'information suivante[4]: la maison Carlo Erba (Milan), qui avait mis sur le marché, ces dernières années, des bobines de réaction en téflon pour son analyseur

automatique à flux continu, vient d'y renoncer pour revenir aux bobines de verre, les flux obtenus n'étant pas suffisamments constants.

BIBLIOGRAPHIE

1 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, en voie de publication.
2 J. Bosset, B. Blanc et E. Plattner, *Anal. Chim. Acta*, 75 (1975) 343.
3 L. Amador, *Clin. Chem.*, 18 (2) (1972) 164.
4 Communication personnelle de la représentation suisse, la maison Brechbühler (CH-8902-Urdorf).